



Universidade de Évora

Escola de Ciências e Tecnologia

Síntese e Avaliação da Atividade Biológica de Bisfosfonatos Derivados do Indazole

Guilhermina Do Carmo Andrade Negrinho Matias

**Tese para obtenção do grau de mestre em Bioquímica pela
Universidade de Évora**

Orientador: Prof. Doutor António Paulo Teixeira

Co-orientadores: Prof.^a Doutora Ana Teresa Caldeira

Prof.^a Doutora Maria do Rosário Martins

Évora, Setembro de 2012



Síntese e Avaliação da Atividade Biológica de Bisfosfonatos Derivados do Indazole

Guilhermina Do Carmo Andrade Negrinho Matias

Tese para obtenção do grau de mestre em Bioquímica pela Universidade de Évora

Orientador: Prof. Doutor António Paulo Teixeira

Co-orientadores: Prof.^a Doutora Ana Teresa Caldeira

Prof.^a Doutora Maria do Rosário Martins

*Dedico esta tese à Blue e à Tita
por serem seres superiores ...*

Agradecimentos

À minha família em especial, à Blue e à Tita, que são as fontes da minha inspiração e motivação diária, sem vocês esta etapa não tinha sido concluída.

Ao Prof. Doutor António Teixeira, meu orientador, pela oportunidade, disponibilidade e conhecimento ao longo de toda esta jornada.

À Prof. Doutora Ana Teresa Caldeira, pelo conhecimento e tempo cedido ao longo desta etapa.

À Prof. Doutora Maria do Rosário Martins, pela orientação e tempo dispensado.

À Doutora Fátima Teixeira cuja colaboração foi fundamental, pela cedência de compostos ao longo das diferentes etapas do trabalho.

Ao Francisco Nascimento, cuja inteligência e integridade são fontes de admiração e inspiração para mim, agradeço pelo carinho, motivação e infinita paciência ao longo de todos estes anos.

Aos meus amigos, em especial às minhas amigas Mónica Monteiro, Ana Marta Fialho e Fabrícia Coelho pela maravilhosa amizade e parceria em todos os momentos.

À colega do mestrado Susana Sengo pela maravilhosa amizade que desenvolvemos ao longo deste percurso académico, pelos momentos de diversão e as inúmeras missões realizadas com muito sucesso.

Aos colegas do laboratório de química orgânica nomeadamente ao Pikasso e ao Barrulas, e às colegas do laboratório de farmacologia Silvia Arantes, Cátia Salvador e Anabela Cabeça pela ajuda em várias etapas deste trabalho.

À Sic Mulher por transmitir o programa Biggest Loser, que me inspirou na escrita desta tese... apesar de não ter perdido peso propriamente o facto de finalizar desta etapa deixa-me de facto muito mais leve.

Resumo

Os bisfosfonatos são uma classe importante de fármacos com largo espectro de aplicações no tratamento de doenças do metabolismo mineral do osso. Recentemente, tem sido estudada as suas atividades antitumoral e contra diversos microrganismos.

Neste trabalho, efetuou-se a síntese de bisfosfonatos derivados do indazole. Os bisfosfonatos utilizados neste trabalho foram sujeitos a estudos de avaliação de atividade antioxidante, toxicidade e atividade biológica.

A atividade antioxidante foi determinada por dois métodos: o método do DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) e o método do β -caroteno/ácido linoleico. Os BPs apresentaram atividade antioxidante preferencialmente pelo segundo método.

Na avaliação da toxicidade, utilizou-se a *Artemia salina*, com determinação do valor de CL50. Os BPs estudados apresentaram uma toxicidade superior ao BP comercial estudado.

Foi ainda avaliada a atividade antimicrobiana pelo método de difusão em meio sólido e a determinação da concentração mínima inibitória. Nestes ensaios, os BPs mostraram-se mais ativos para as bactérias patogénicas gram negativas, especialmente para *Enterobactereaceae*.

Palavra-chave: bisfosfonatos, indazole, síntese, atividade antioxidante, atividade biológica.

“Synthesis and Evaluation of the Biological Activity of Bisphosphonates Derived from Indazole”

Abstrat

Bisphosphonates (BPs) are an important class of drugs with broad spectrum of applications in the treatment of diseases of bone mineral metabolism. Recently, it has been studied their antitumoral activity and against microorganisms.

Here, we report the synthesis of bisphosphonates derived from indazole. These bisphosphonates were evaluated towards their antioxidant activity, toxicity and biologic activity.

The antioxidant activity of BPs was evaluated using two different methods: the DPPH (1,1-diphenyl-2-picril-hidrazyl) and the β -carotene/linoleic acid methods. The BPs showed higher antioxidant activity using the second method.

The evaluation of their toxicity was done using *Artemia salina* since it is a good environmental bioindicator. The BPs showed higher toxicity than a commercial BP used as standard.

The evaluation of the antimicrobial activity was done by the diffusion method on solid medium and the determination of minimum inhibitory concentration (CMI). In these tests, BPs showed more active towards gram negative pathogenic bacteria, especially for *Enterobactereaceae*.

Key words: bisphosphonates, indazole, synthesis, antioxidant activity and biological activity.

Lista de abreviaturas

¹H RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
ATP	Trifosfato de adenosina
BHA	<i>tert</i> -butil-4-hidroxianisol
BHT	<i>tert</i> -butil-hidroxitolueno
BLCs	<i>Bone lining cells</i>
BPs	Bisfosfonatos
CFU-GM	Unidades formadoras de colónias de granulócitos- macrófagos
CH₃	Grupo metilo
CL50	Concentração letal que provoca a mortalidade de 50% de uma população
CMI	Concentração mínima inibitória
d	Dupleto
DMSO	Dimetilsufóxido
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
dt	Duplo tripleto
ALP	Fosfatase alcalina
FPP	Farnesil difosfato
FPPS	Farnesil difosfato sintetase
GGPP	Geranylgeranyl pirofosfato
HA	Hidroxiapatite

IC50	Concentração que inibe 50% da oxidação
MeOH	Metanol
NA	<i>Nutrient Agar</i>
O₂ •	Radical superóxido
PPi	Pirosfosfato inorgânico
PTH	Hormona paratiróideia
rpm	Rotações por minuto
ROS	Espécies reativas de oxigênio
s	Singleto
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
sp./spp.	Espécie
SPE	Substâncias poliméricas extracelulares
t	Tripleto
TBHQ	<i>terc</i> -butil-hidroquinona
UFC	Unidades formadoras de colónias

Índice

1.Introdução.....	1
1.1 Bisfosfonatos.....	1
1.1.1 Perspectiva histórica.....	1
1.1.2 Estrutura Química.....	2
1.1.3 Ação no tecido ósseo.....	5
1.1.3.1 Mecanismo de remodelação do tecido ósseo.....	5
1.1.3.2 Mecanismo de Ação.....	8
1.1.4 Farmacocinética.....	11
1.1.5 Indicações terapêuticas.....	13
1.1.6 Ação antitumoral dos bisfosfonatos.....	15
1.1.7 Obtenção de Bisfosfonatos.....	16
1.1.7.1 Síntese de Bisfosfonatos.....	16
1.1.7.2 Purificação dos Bisfosfonatos.....	19
1.1.7.3 Bisfosfonatos derivados do indazole.....	20
1.2. Atividade biológica de novos compostos.....	22
1.2.1 Fármacos e ambiente.....	22
1.2.2 Ensaio de toxicidade.....	23
1.2.2.1 Considerações gerais.....	23
1.2.2.2 Bioensaio utilizando <i>Artemia salina</i>	24
1.2.3 Atividade Antioxidante.....	25
1.2.3.1 Radicais Livres.....	25
1.2.3.2 Antioxidantes.....	26
1.2.3.3 Determinação da atividade antioxidante.....	29
1.2.4 Atividade antimicrobiana.....	31
1.2.4.1 Considerações gerais.....	31
1.2.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	31
2. Problemática e Objetivos.....	35
2.1 Problemática.....	35
2.2 Objetivos gerais.....	35

2.3 Objetivos específicos.....	36
3. Materias e Métodos.....	37
<u>3.1 Síntese dos bisfosfonatos</u>	<u>37</u>
3.1.1 Síntese do ácido [hidroxi-(1 <i>H</i> -indazol-3-il)metileno]bisfosfónico BP2	37
3.1.2 Síntese do ácido [hidroxi(1-metil-1 <i>H</i> -indazol-3-il)metileno]bisfosfónico BP3.....	38
3.1.3 Síntese do ácido 1-hidroxi-2-(1 <i>H</i> -indazol-1-il)etano-1,1-di-il]bisfosfónico BP4.....	39
3.1.4 Outros bisfosfonatos utilizados	40
3.2 Determinação da toxicidade utilizando o crustáceo <i>Artemia salina</i>	40
3.2.1 Meio de cultura.....	40
3.2.2 Procedimento.....	40
3.2.3 Preparação das soluções dos bisfosfonatos	41
3.3 Determinação da atividade antioxidante	41
3.3.1 Método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)	42
3.3.2 Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β - caroteno/ácido linoleico....	43
3.3.3 Avaliação do efeito protetor na hemólise do eritrócito	44
3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana	46
3.4.1 Microrganismos testados.....	46
3.4.2 Preparação do inóculo	47
3.4.3 Método de difusão em meio sólido	47
3.4.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	48
4.Resultados e Discussão.....	50
<u>4.1 Síntese dos compostos.....</u>	<u>50</u>
4.2 Avaliação da Atividade Antioxidante	53
4.2.1 Método do radical DPPH	53
4.2.2 Método β -caroteno/Ácido linoleico	59
4.2.3 Avaliação do efeito protetor na hemólise do eritrócito	62
4.3 Avaliação da toxicidade em <i>Artemia salina</i>	66
4.4 Determinação da atividade antimicrobiana	68
4.4.1 Ensaio de difusão em meio sólido.....	68
4.4.2 Determinação da concentração mínima inibitória.....	72
5. Conclusão.....	74
Bibliografia.....	76
Anexos.....	86

<u>Anexo I- Avaliação da atividade antioxidante</u>	86
Anexo II – Avaliação da toxicidade dos BPs face a <i>Artemia salina</i>	93
Anexo III- Avaliação da atividade antimicrobiana	97

Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1	Estrutura de pirofosfato e bisfosfonato (adaptado e modificado de Reszka, 2004). 2
Figura 2	Estrutura química dos bisfosfonatos (HA- representa a hidroxiapatite), (adaptado e modificado de Bartl <i>et al.</i> , 2007). 3
Figura 3	Estrutura Química dos Bisfosfonatos (adaptado e modificado de Reszka, 2004). 4
Figura 4	Ciclo de formação e a reabsorção óssea e principais intervenientes (adaptado e modificado de Fernandes <i>et al.</i> , 2005). 5
Figura 5	Mecanismo de ação dos bisfosfonatos, exemplificação da ligação ao cálcio presente no tecido ósseo (adaptado e modificado de Bartl <i>et al.</i> , 2007). 9
Figura 6	Apresentação esquemática de mecanismos de ação dos bisfosfonatos (modificado de Rodan et Fleish, 1996). 10
Figura 7	Interação dos BPs na via do mevalonato (adaptado de Drake M., <i>et al</i> 2008). 11
Figura 8	Síntese do etidronato (adaptado de Wada, 1971). 16
Figura 9	Método para obtenção de bisfosfonatos (adapato de Kieczkowski, 1995). 17
Figura 10	Método indireto para obtenção de bisfosfonatos (adaptado de Lecouvey, 2000). 18
Figura 11	Reação de Michaelis-Becker para obtenção de bisfosfonatos (adaptado de Lecouvey, 2000). 19
Figura 12	Método de Lecouvey para obtenção de ácidos bisfosfónicos (adaptado de Lecouvey, 2001). 19
Figura 13	Tautomerismo anelar do indazole 1. 21
Figura 14	Estrutura dos antioxidantes utilizados no presente estudo dos bisfosfonatos, sendo antioxidantes naturais a quercetina, o ácido ascórbico e o β -caroteno, e o BHT um antioxidante sintético. 28
Figura 15	Esquema da síntese do bisfosfonato designado como BP2. 38
Figura 16	Esquema da síntese do bisfosfonato designado como BP3. 39
Figura 17	Esquema da síntese do bisfosfonato designado como BP4. 40
Figura 18	Síntese de BPs por meio da reação entre o cloreto de acilo e o tris(trimetilsilil)fosfito 50

(adaptado de Leucovery *et al.*, 2001).

Figura 19	Síntese de cloretos de acilo (adaptado de Vogel, 1951).	51
Figura 20	Estrutura química dos compostos sintetizados e utilizados no estudo.	51
Figura 21	Estrutura química do GABA-BP (alendronato), bisfosfonato comercial, utilizado como controlo positivo.	52
Figura 22	Estrutura química dos outros BPs utilizados no estudo.	52
Figura 23	Molécula de DPPH: A – na forma de radical livre estável; B – na forma de não radical. (adaptado de Abdalla <i>et al.</i> , 1999).	54
Figura 24	Estrutura química da quercetina, com indicação dos grupos que conferem a propriedade antioxidante (adaptado de Williams, 2004).	55
Figura 25	Reação química entre o BHT e o radical DPPH• (adaptado de Hocman, 1988).	55
Figura 26	Esquema da reação de oxidação do ácido ascórbico a ácido desidroascórbico, com a formação do radical ascorbilo como composto intermediário (Buettner e Schafer, 1997).	56
Figura 27	Atividade antioxidante (% de inibição de oxidação) dos BPs pelo método DPPH. Os valores correspondem à média de 6 replicados.	57
Figura 28	Atividade antioxidante dos BPs pelo método DPPH, expressos em equivalentes de de ácido ascórbico ($\mu\text{g/mL}$).	58
Figura 29	Atividade antioxidante dos BPs pelo método DPPH, expressos em equivalentes de quercetina ($\mu\text{g/mL}$).	58
Figura 30	Atividade antioxidante (% de inibição de oxidação) dos BPs, pelo método β -caroteno/Ácido linoleico. Os valores correspondem à média de 6 replicados.	60
Figura 31	Atividade antioxidante dos BPs, pelo método β -caroteno/Ácido linoleico, expresso em equivalentes de quercetina.	61
Figura 32	Avaliação do efeito protetor do eritrócito, curva dos padrões, traduzida na % de meta-hemólise.	63
Figura 33	Avaliação do efeito protetor do eritrócito, curva dos padrões, traduzida na % de meta-hemoglobina.	64
Figura 34	Avaliação do efeito protetor do eritrócito dos BPs, e DMSO (controlo positivo dos BPs), traduzida na % de hemólise.	64
Figura 35	Avaliação do efeito protetor do eritrócito dos BPs, e DMSO (controlo positivo dos BPs), traduzida na % de meta-hemoglobina.	65

Índice de Tabelas

	Pág.
Tabela 1 Bisfosfonatos frequentemente utilizados (vias de administração e potências relativas associadas à presença da cadeia R ₂ nitrogenada), adaptado de Fleish, H. (2007).	12
Tabela 2 Trabalhos pré-clínicos sobre a ação anti-tumoral dos bisfosfonatos em linhagens de células tumorais.	15
Tabela 3 Descrição das bactérias em estudo (adaptado de Ferreira, 2000; Hogg, 2005).	33
Tabela 4 Descrição das leveduras em estudo (Ferreira, 2000; Hogg, 2005).	34
Tabela 5 Concentrações dos compostos utilizados no bioensaio com <i>Artemia salina</i> .	41
Tabela 6 IC50 dos padrões pelo método do radical DPPH.	56
Tabela 7 IC50 dos compostos pelo método β-caroteno/Ácido linoleico.	61
Tabela 8 Valores de concentração letal 50% (CL50) obtidos pelos compostos BP2, BP3, BP4 e IP86 face a <i>Artemia salina</i> .	67
Tabela 9 Atividade antibacteriana dos bifosfonatos.	68
Tabela 10 Registo da atividade antibacteriana dos antibióticos padrão.	69
Tabela 11 Atividade antifúngica dos bifosfonatos.	72
Tabela 12 Valores de CMI (µg/mL) obtidos para os BPs e para um antibacteriano de síntese (cloridrato de tetraciclina).	73

1- Introdução

1.1 Bisfosfonatos

1.1.1 Perspectiva histórica

Os primeiros bisfosfonatos foram sintetizados há mais de cem anos por Von Baeyer e Hofmann; inicialmente estes compostos eram utilizados na indústria como agentes anti-calcário e anti-corrosivos ou como aditivos na indústria têxtil, oleica e de fertilizantes. Só nas últimas cinco décadas é que os BPs começaram a ser desenvolvidos como medicamentos para o tratamento de doenças ósseas, dentárias e do metabolismo do cálcio (Fleisch, 2002).

No início dos anos 60, Fleisch provou que o pirofosfato inorgânico (PPi) prevenia a calcificação de fluidos corporais pela ligação aos cristais de hidroxiapatite. Também revelou que as formas orais de PPi eram inativadas pelas pirofosfatases segregadas pela mucosa gastrointestinal. Numa tentativa de encontrar análogos estáveis dos PPi, os difosfonatos (agora chamados de bisfosfonatos) estavam entre os fármacos que foram investigadas ao longo do tempo. Os bisfosfonatos toleravam a via oral sem serem inativados, o que se tornou a chave do seu grande sucesso. Estes compostos também inibiam a dissolução dos cristais de hidroxiapatite. Estudos posteriores mostraram ainda que eles previnem a reabsorção óssea pela inibição da ação dos osteoclastos (Gutta e Louis, 2007).

Após mais de três décadas de pesquisa e desenvolvimento, os bisfosfonatos tornaram-se indispensáveis no tratamento de doenças ósseas, tanto benignas quanto malignas (Castro *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2004). Estes compostos são potentes inibidores da reabsorção óssea mediada por osteoclastos e são efectivos na redução das concentrações de cálcio no soro de pacientes com hipercalemia maligna. Além disso, constituem uma nova modalidade de tratamento para metástases ósseas, reduzindo a quantidade e o índice de complicações esqueléticas no mieloma múltiplo e no cancro da mama avançado, assim como aliviando a dor óssea causada por metástases de vários tumores sólidos, com consequente aumento da qualidade de vida do paciente (Castro *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2004).

1.1.2 Estrutura Química

Os bisfosfonatos são análogos químicos sintéticos dos pirofosfatos (Figura 1). Os BPs são uma classe de substâncias químicas que exibem ligações estáveis P-C-P em vez de ligações lábeis P-O-P na sua estrutura (Figura 1).

Os pirofosfatos foram os primeiros a serem estudados devido às suas propriedades de impedir a cristalização do fosfato de cálcio nas soluções e sua dissolução *in vitro*. *In vivo* os pirofosfatos inibem as calcificações ectópicas nas artérias, pele e em outros órgãos. Desta forma começaram a ser utilizados no tratamento de patologias ósseas como regulador de calcificações e de descalcificações *in vivo*. Os efeitos terapêuticos, porém, não se mostraram satisfatórios devido à sua inatividade quando administradas via oral e à rápida hidrólise, quando aplicadas por via parenteral.

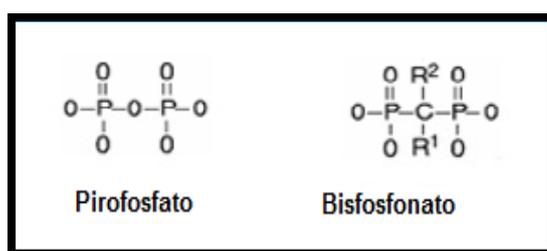


Figura 1 - Estrutura de pirofosfato e bisfosfonato (adaptado e modificado de Reszka, 2004).

Esta incapacidade de ação dos pirofosfatos propiciou o desenvolvimento de análogos com ações similares, porém mais resistentes à ação enzimática, como é o caso dos bisfosfonatos. A ação dos bisfosfonatos deve-se à sua semelhança estrutural com este grupo de compostos (Castro *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2004).

A modificação do átomo central de oxigênio por um átomo de carbono, faz com que sejam resistentes à degradação enzimática e tenham um tempo de meia-vida biológica maior, o suficiente para influenciar o metabolismo ósseo (Licata, 1997). Diferentes substituintes nos radicais R₁ e R₂ (Figura 2), ligados ao carbono central, conferem aos bisfosfonatos afinidade pelos cristais ósseos, enquanto que o grupo R₂ é responsável pela potência e atividade farmacológica (Fleisch, 1989). A presença do grupo hidroxilo

(OH) em R₁ confere maior fixação ao osso. Por outro lado a presença de um átomo de cloro (Cl) em R₁, confere uma fixação reduzida (Reszka, 2004).

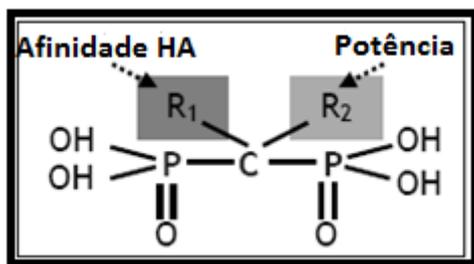


Figura 2- Estrutura química dos bisfosfonatos (HA- representa a hidroxiapatite), (adaptado e modificado de Bartl *et al.*, 2007).

A estrutura básica P-C-P permite um grande número de variações moleculares dando possibilidades para a obtenção de um número elevado de compostos. Cada bisfosfonato apresenta uma estrutura físico-química peculiar e função biológica específica. Diversos fármacos da classe dos bisfosfonatos foram sintetizados, nos quais os grupos substituintes R₁ e R₂ variaram, sistematicamente com propósitos definidos:

- ✦ aumentando a afinidade óssea;
- ✦ melhorando o perfil terapêutico: potência, seletividade e toxicidade;
- ✦ adquirindo nova atividade farmacológica e alterando a biodisponibilidade da molécula.

O grupo R₁ é responsável pela afinidade à hidroxiapatite e por isso controla a fixação ao osso. O grupo R₂ é o responsável pela maior ou menor potência dos bisfosfonatos. De acordo com a sua estrutura e potência, existem três gerações de bisfosfonatos. A primeira geração é composta pelos BPs não-nitrogenados, que inclui os análogos de trifosfato de adenosina, etidronato, clodronato (Figura 3) (Lehenkari *et al.*, 2002; Reszka, 2004) e o tiludronato (Carter *et al.*, 2005), que possui potência anti-reabsortiva similar à do clodronato. A segunda e a terceira gerações são compostas por BPs nitrogenados. Os da segunda geração, alendronato, pamidronato e ibandronato (Figura 3), são de 10 a 1000 vezes mais potentes que os da primeira geração (Lin; 1996). Os da terceira geração contêm uma cadeia cíclica, como o risedronato e zoledronato (Figura 3) (Rogers *et al.*, 2000). Este último grupo, cuja potência é 100 a 850 vezes superior à do

pamidronato, é o mais potente entre os já submetidos a testes *in vitro* e *in vivo* (Body, 1997).

O primeiro bisfosfonato utilizado no tratamento de uma doença humana foi o etidronato, sintetizado em 1898, mas utilizado na terapêutica apenas em 1971 (Smith, 1971).

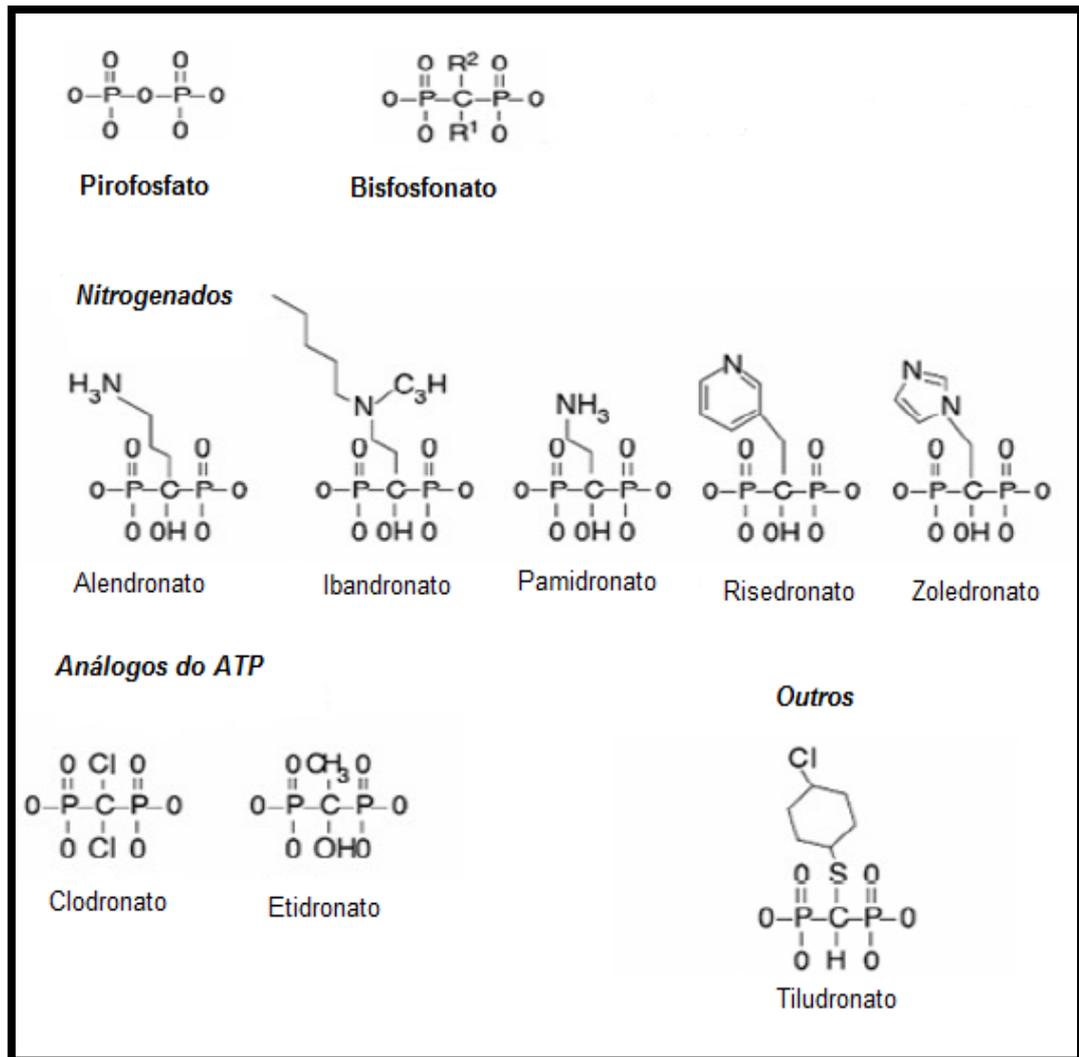


Figura 3- Estrutura química de alguns bisfosfonatos (adaptado e modificado de Reszka, 2004).geração

1.1.3 Ação no tecido ósseo

1.1.3.1 Mecanismo de remodelação do tecido ósseo

O esqueleto é uma estrutura altamente especializada e dinâmica que sofre remodelação constante. O osso é um tecido conjuntivo rígido, composto por células especializadas, matriz mineralizada e não mineralizada e espaços que incluem a cavidade medular óssea, canais vasculares, canalículos e lacunas. O tecido ósseo calcificado é composto por uma matriz extracelular que contém moléculas orgânicas e inorgânicas e cristais de hidroxiapatite. A presença de cristais de hidroxiapatite torna este tecido único, não apenas do ponto de vista biossintético, mas, também, em termos de metabolismo. Assim, durante o crescimento e desenvolvimento do organismo, o osso é um tecido vital em constante atividade (Fernandes *et al.*, 2005).

Durante a remodelação óssea, os osteoclastos removem o osso velho, e os osteoblastos depositam osso novo. A remodelação óssea converte o osso reticular em osso lamelar, está envolvida no crescimento ósseo, na modificação da configuração óssea, na adaptação dos ossos ao *stress* mecânico, na reparação óssea, e na regulação dos níveis de cálcio no organismo. A remodelação é também responsável pela formação de novos *osteons* no osso compacto (Seely *et al.*, 2003). Logo a remodelação óssea é um mecanismo fundamental para manter a integridade estrutural do esqueleto, bem como para funções metabólicas, como o armazenamento de cálcio, fosfato e magnésio (Fernandes *et al.*, 2005).

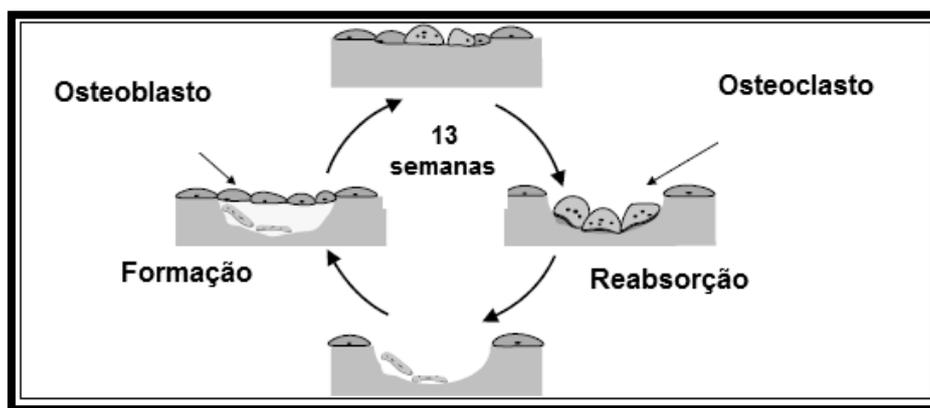


Figura 4- Ciclo de formação e reabsorção óssea e principais intervenientes (adaptado e modificado de Fernandes *et al.*, 2005).

Osteoblastos

A diferenciação dos osteoblastos a partir de células estaminais é controlada por um grupo de genes designado *Hedgehog family*; entre eles dois dos principais genes são: *Ihh* (*Indian hedgehog*) e *Shh* (*Sonic hedgehog*). Os dois factores mais relevantes na diferenciação osteoblástica são o factor de transcrição *Cbfa1* e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs, *bone morphogenetic proteins*) (Fernandéz *et al.*, 2009).

Os osteoblastos são células grandes com cerca de 20 a 30 µm, possuem um citoplasma basófilo e com retículo endoplasmático rugoso abundante e complexo de Golgi bem desenvolvido. Osteoblastos são originados a partir de células estaminais mesenquimais provenientes da medula óssea, endósteo, periósteo e periciclos perivasculares. Prolongam-se através da matriz de modo a comunicar a rede de osteócitos e outros osteoblastos; estes comunicam entre si através de proteínas ou integrinas transmembranares. Estas agem como ligações entre células ou entre as células e a matriz extracelular, permitindo a passagem de cálcio, citoquinas e prostaglandinas (Fernandéz *et al.*, 2009).

Os osteoblastos são responsáveis pela síntese de matriz óssea, a um ritmo de 2 a 3 µm por dia, e expressam um enzima característica, a fosfatase alcalina (ALP). Algumas das principais funções dos osteoblastos são: síntese de proteínas de colagénio e não-colagénio na matriz óssea; organização das fibras na matriz extracelular; contribuem para a mineralização de substância osteóide; são mediadores do processo de reabsorção óssea por parte dos osteoclastos, através da síntese de várias citoquinas e capacidade de sintetizar factores de crescimento (Fernandéz *et al.*, 2009).

A vida média de um osteoblasto pode variar entre 1 a 10 semanas e, após este tempo, estes podem entrar em apoptose ou então transformar-se em “*bone lining cells*” (BLCs), também designadas células de revestimento ósseo, ou em osteócitos (15%). As BLCs são uma forma inactiva dos osteoblastos, são células longas e achatadas e com poucos organelos no seu citoplasma e também podem expressar, tal como os osteoblastos, sialoproteína óssea, osteopontina, osteonectina e fosfatase alcalina, bem como receptores da hormona paratiróide (PTH). Estas permanecem ao longo da superfície endosteal, formando com o endósteo uma camada protetora da superfície óssea, que desempenha um importante papel na remodelação óssea (Fernandéz *et al.*, 2009).

Após a matriz óssea estar mineralizada alguns dos osteoblastos ficam "aprisionados" nesta matriz, transformando-se em osteócitos. Estes vão ser encontrados no meio do osso, e não na superfície óssea como acontece com osteoblastos, osteoclastos e BLCs. Os osteócitos são as células ósseas mais abundantes no osso (10 vezes mais em relação aos osteoblastos), têm uma forma de estrela e encontram-se em lacunas, os seus processos citoplasmáticos comunicam entre si através de canalículos, cheios com fluido ósseo extracelular.

Osteoclastos

Os osteoclastos são as células ósseas mais relevantes na ação dos BPs, visto que estes compostos atuam diretamente sobre os osteoclastos após serem fagocitados no processo de digestão/dissolução óssea, interferindo com vários processos intracelulares levando à apoptose e diminuindo de uma forma geral a renovação e remodelação óssea a um nível sistémico (Fernandéz *et al.*, 2009).

Os osteoclastos formam-se a partir de células estaminais hematopoiéticas provenientes da medula óssea conhecidas como unidades formadoras de colónias de granulócitos-macrófagos (CFU-GM), precursores de macrófagos e monócitos (Fernandéz *et al.*, 2009).

Existem duas características específicas na membrana dos osteoclastos que os torna únicos: a presença de uma zona estriada da membrana, onde ocorre a reabsorção óssea, e uma área da membrana rica em microfilamentos, onde estão presentes integrinas que servem para a célula se fixar à matriz. Assim quando um osteoblasto se desloca para a zona onde vai ocorrer a reabsorção óssea, adere a essa zona por meio da sua zona da membrana estriada e sela a área adjacente com as suas integrinas. As integrinas são selectivas para algumas proteínas presentes na matriz óssea como a sequência Arg-Gly-Asp no colagénio e outras proteínas na matriz osteóide. Neste ponto em que se inicia a reabsorção do osso o pH no meio torna-se ácido, devido aos ácidos segregados pelos osteoclastos produzidos pela anidrase carbonica II e enzimas proteolíticas como as collagenases, metaloproteases, catepsina K, glucuronidase, que vão dar início à reabsorção óssea dissolvendo primeiro a matriz orgânica e depois a matriz óssea. (Beker, 2001; Fernandéz *et al.*, 2009).

1.1.3.2 Mecanismo de Ação

O tecido ósseo é estruturalmente constituído por osteoclastos, osteoblastos e osteócitos e, tendo os bisfosfonatos grande afinidade para os iões Ca^{2+} , a matriz óssea mineralizada será um alvo selectivo dos bisfosfonatos.

Os bisfosfonatos têm deste modo uma ação importante na remodelação da estrutura óssea, principalmente na ação osteoclástica, afetando deste modo a reabsorção óssea.

O mecanismo molecular pelo qual os bisfosfonatos inibem a reabsorção óssea ainda não está completamente esclarecido. Inicialmente, acreditava-se que se tratava de um mecanismo físico-químico, isto é, que a incorporação na matriz óssea era suficiente para que tivesse efeitos na remodelação óssea. Contudo, ultimamente, tem-se tornado claro que efeitos celulares estão também envolvidos (Van den Wyngaert *et al.*, 2006).

Os bisfosfonatos apresentam uma estrutura que lhes confere uma resistência à hidrólise enzimática e permite-lhes fixarem-se na superfície dos cristais de hidroxiapatite, com uma rápida e eficiente união do fármaco à superfície mineral óssea (Figura 5). A sua ação primordial consiste em inibir a reabsorção óssea mediante a supressão da atividade osteoclástica (Férrandez, 2006). É importante salientar que estes fármacos inibem as reabsorções ósseas quer *in vitro* quer *in vivo*, mesmo quando decorrentes de causas e agentes diferentes (Felix, 1981; Fleisch, 1989; Fleisch, 1991; Simmelink, 1987).

Apesar dos efeitos na reabsorção óssea não estarem completamente elucidados, entre os efeitos observados destacam-se a redução da produção do ácido láctico e a inibição de certos enzimas lisossomais, da síntese de prostaglandinas e da multiplicação de macrófagos e da função dos osteoclastos. Algumas evidências indicam uma ação citotóxica direta sobre os osteoclastos ou induzindo-os à apoptose (Hughes *et al.*, 1995; Rodan, 1998; Russel, 1999).

Os efeitos dos BPs ocorrem em três níveis: tecidual, celular e molecular (Rodan, 1998; Rodan *et al.*, 1996). No nível tecidual promove a redução do *turnover* ósseo, como se demonstrou com a utilização de marcadores bioquímicos. Os bisfosfonatos reduzem a extensão das regiões em reabsorção e a profundidade nas áreas erodidas, conforme demonstraram Boyce *et al.*, 1995; Ott *et al.*, 1993 e Storm *et al.*, 1993. A nível celular os bisfosfonatos reduzem a atividade osteoclástica, uma vez que inibem o recrutamento

destas células para a superfície óssea, inibem a atividade celular, reduzem o tempo de vida celular pela indução da apoptose, e alteram a troca mineral na forma físico-química (Rodan, 1998). E a nível molecular os bifosfonatos modulam a função osteoclástica, ao ligarem-se a receptores de superfície presentes na célula óssea ou a enzimas intracelulares.

A apoptose, ou morte celular programada, foi descrita nos osteoclastos há muitos anos e talvez seja a via normal de morte dessas células (Rodan, 1998). O tempo de vida dos osteoclastos, estimado a partir de estudos microscópicos, é de duas a quatro semanas *in vivo* e de no máximo de duas semanas *in vitro*. Já foi descrito que os bisfosfonatos aumentam a apoptose de osteoclastos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Parfitt, 1996; Rodan, 1998).

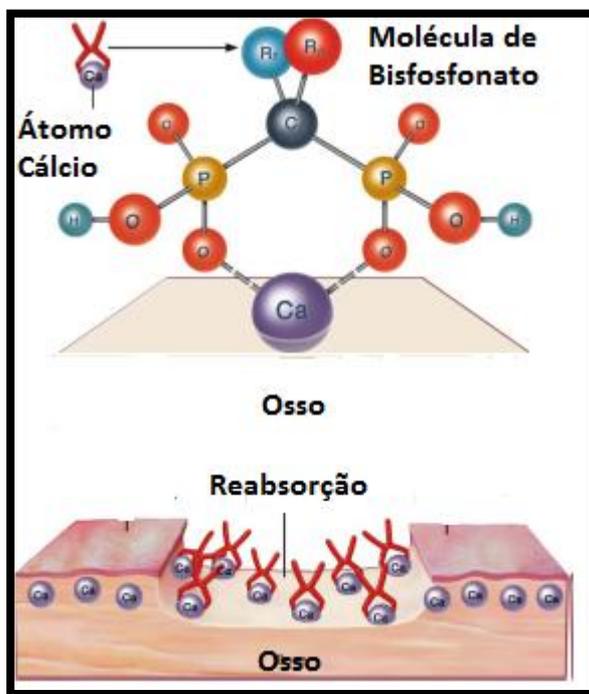


Figura 5- Mecanismo de ação dos bisfosfonatos, com a exemplificação da ligação ao cálcio presente no tecido ósseo (adaptado e modificado de Bartl *et al.*, 2007).

Durante a reabsorção óssea os bisfosfonatos incorporados nos ossos são libertados e internalizados nos osteoclastos por endocitose afetando-os diretamente, uma vez que estes perdem a sua borda activa iniciando-se a quebra do seu citoesqueleto, desmobilizando a atividade celular reabsortiva (Figura 6) (Simmelink, 1999).

Em cultura de células, Plotkin *et al.*, 1999, constataram que os bisfosfonatos inibem ou controlam a reabsorção atuando sobre os osteoblastos e osteócitos, inibindo a apoptose destas células. Entre os possíveis mecanismos de ação dos bisfosfonatos na fisiologia óssea afirma-se que (Figura 6):

- Interferem ou alteram o citoesqueleto de células clásticas;
- Interferem na membrana celular dos clastos, especialmente nas bordas pregueadas;
- Diminuem a proteína tirosina fosfatase;
- Induzem os clastos à apoptose;
- Inibem a adesão dos osteoclastos ao osso;
- Inibem o bombeamento de prótons dos osteoclastos;
- Inibem a formação dos osteoclastos;
- Atuam nos osteoblastos inibindo o estimulador do recrutamento de células osteoclásticas;
- Atuam nos osteoblastos estimulando o inibidor do recrutamento de células osteoclásticas;
- Atuam nos osteoblastos inibindo a atividade dos osteoclastos.

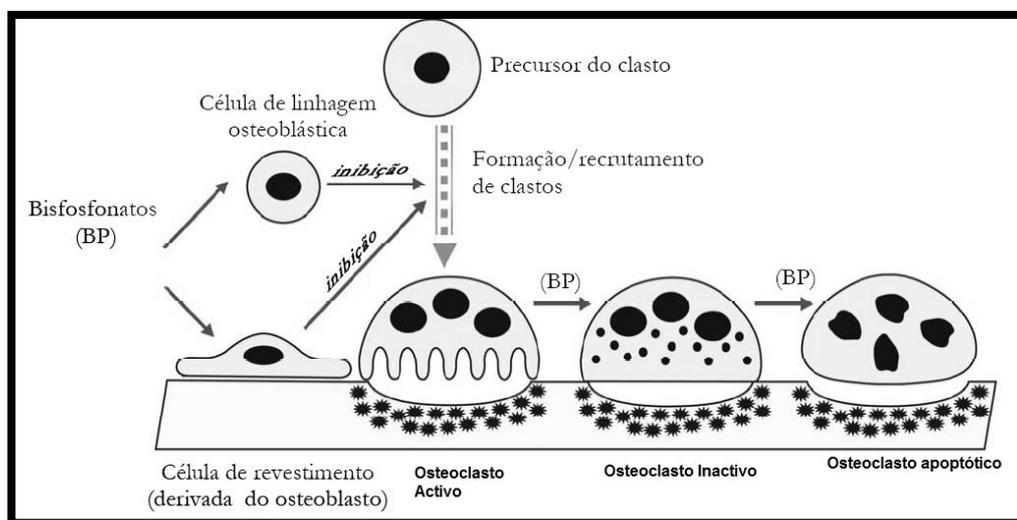


Figura 6 - Apresentação esquemática de mecanismos de ação dos bisfosfonatos (modificado de Rodan e Fleish, 1996).

Os BPs de primeira geração (etidronato, clodronato e tiludronato), mais semelhantes ao PPI e que não contêm azoto na sua cadeia R_2 , atuam incorporando-se nas moléculas recém formadas de trifosfato de adenosina (ATP) pela classe II aminoacil-transferase da

RNA sintetase presentes na superfície óssea, sendo posteriormente captados pelos osteoclastos. Estes análogos de ATP não hidrolisáveis são citotóxicos para a célula devido à inibição dos vários processos celulares dependentes de ATP; assim a sua acumulação no interior da célula vai levar à apoptose da mesma (Drake *et al.*, 2008).

O mecanismo de ação dos BPs de segunda e terceira geração (alendronato, pamidronato, zoledronato, risedronato) difere dos de primeira geração devido à presença de azoto no grupo R₂, que lhes confere uma capacidade de inibição da reabsorção óssea, muito superior aos de primeira geração. Estes BPs inibem a via do mevalonato, bloqueando o enzima FPPS (farnesil-difosfato sintetase), que é necessária para a síntese da farnesil difosfato e geranil difosfato, o que vai resultar numa carência intracelular, entre outros, de geranilgeranil pirofosfato (GGPP) e de farnesil difosfato (FPP), ambos necessários para a modificação lipídica de pequenas proteínas sinalizadoras na atividade da GTPase (Figura 7) (Drake *et al.*, 2008).

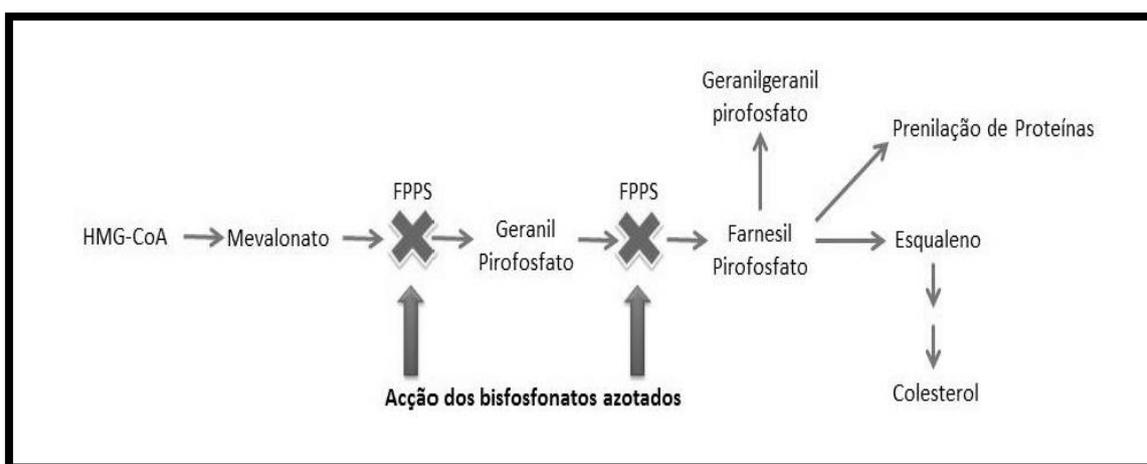


Figura 7- Interação dos BPs na via do mevalonato (adaptado de Drake *et al.*, 2008).

Como resultado desta disfunção, há alteração da membrana celular lipídica do osteoclasto, levando a uma alteração do seu mecanismo celular, provocando a apoptose osteoclástica (Kumar *et al.*, 2007).

1.1.4 Farmacocinética

O primeiro bisfosfonato utilizado no tratamento de doenças ósseas foi o etidronato. E estudos posteriores demonstraram que os bisfosfonatos que possuem um átomo de

nitrogênio na sua cadeia lateral R₂ possuem uma potência relativa superior comparativamente à primeira molécula usada na terapêutica – o etidronato (Fernandes *et al.*, 2005).

A via de administração também é importante, pois dependendo da via utilizada, o fármaco pode ter uma absorção muito mais acelerada, e estar mais rapidamente disponível para se depositar no osso e ter ação farmacológica.

Os bisfosfonatos administrados por via oral são pouco absorvidos pelo organismo (Farias, 2005; Gertz *et al.*, 1991), com taxa de absorção ente 1 e 10% da dose administrada. Se administramos por infusão intravenosa, são rapidamente removidos do plasma e exibem taxa de excreção renal de 40% nas primeiras 24 horas. Não ocorre metabolização pelo tecido ósseo (Khan *et al.*, 1997), a excreção renal é a única via de eliminação. Por outro lado, uma vez ligados ao tecido ósseo, só são libertados quando este sofre reabsorção (Lin, 1996). Os BPs são resistentes à degradação enzimática, e a meia-vida no esqueleto pode ser superior a um ano (Licata, 1997).

Os BPs têm efeito cumulativo no tecido ósseo, e dados sugerem que não há a necessidade de reposição (Sato *et al.*, 1991). Os bisfosfonatos sofrem baixa absorção intestinal em humanos, com biodisponibilidade de cerca de 0,7% para o alendronato por exemplo (Lin, 1996).

Tabela1 – Bisfosfonatos frequentemente utilizados, vias de administração e potências relativas associadas à presença da cadeia R₂ nitrogenada, (adaptado de Fleish, 2007; Coelho A., *et al* 2010).

Bisfosfonato	Nome Comercial	Indicação Primária	Via de administração	Cadeia R2 nitrogenada	Potência Relativa
Etidronato	Didronel [®]	Doença de Paget	Oral	Não	1
Tiludronato	Skelid [®]	Doença de Paget	Oral	Não	50
Alendronato	Fosamax [®]	Osteoporose	Oral	Sim	1000
Residronato	Actonel [®]	Osteoporose	Oral	Sim	1000
Ibandronato	Boniva [®]	Osteoporose	Oral	Sim	1000
Pamidronato	Aredia [®]	Metásteses ósseas	Endovenosa	Sim	1000-5000
Zoledronato	Zometa [®]	Metásteses ósseas	Endovenosa	Sim	10 000 ⁺
	Aclasta [®]	Osteoporose	Endovenosa	Sim	10 000 ⁺

Os menos potentes são os BPs não nitrogenados, que são metabolizados pelos osteoclastos para inativar análogos não hidrolisáveis do ATP, que se acumulam intracelularmente, sendo diretamente citotóxicos para as células induzindo apoptose. Por outro lado os bisfosfonatos nitrogenados (pamidronato, alendronato, residronato, ibandronato, ácido zoledrónico), como já foi referido, são os bisfosfonatos mais potentes.

Muitas investigações têm-se focado no efeito dos bisfosfonatos nitrogenados nas células tumorais. *In vitro*, as experiências confirmaram que estes fármacos podem inibir a adesão de células neoplásicas ao osso, reduzir a facilidade para invadirem membranas artificiais e baixar a migração celular, tudo isto em doses incapazes de causar diretamente citotoxicidade ou induzir apoptose das células ósseas (Woo *et al.*, 2006). Embora em menor escala, evidências *in vivo* demonstrando a ação dos bisfosfonatos começam também a surgir, porém necessitando ainda de mais investigações (Vasconcellos *et al.*, 2003).

1.1.5 Indicações terapêuticas

Os BPs são utilizados no tratamento de doenças com repercussão no metabolismo ósseo, isto é onde há atividade excessiva dos osteoclastos, incluindo a doença de Paget, hipercalcemia maligna, osteoporose e doença metastática e osteolítica (Fleisch, 1998).

Os BPs estão indicados neste tipo de patologias por prevenirem a perda de densidade óssea e diminuírem o risco de fratura por inibição do processo de reabsorção óssea. (Woo *et al.*, 2008).

Estudos recentes mostraram que os BPs também inibem o crescimento de protozoários nomeadamente o *Trypanosoma cruzi* (protozoário causador da doença das chagas), quer *in vivo* quer *in vitro* por competição com o pirofosfato na sua via metabólica sem causar toxicidade nas células hospedeiras (Woo *et al.*, 2008).

Martin e colaboradores mostraram também a ação dos BPs, que possuem nitrogénio na cadeia lateral, sobre o crescimento dos parasitas *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum*. O

mecanismo de ação consiste, basicamente, na inibição da formação de proteínas de importância vital para os parasitas (Martin, 2001).

De uma maneira geral os bisfosfonatos apresentam poucos efeitos adversos. O etidronato pode causar inibição na mineralização normal dos ossos, originando fracturas. Distúrbios gastrointestinais e no paladar também podem ocorrer.

Os derivados dos aminobisfosfonatos (alendronato, pamidronato e risedronato) parecem conferir alta potência, sem aumentar os efeitos sobre a mineralização óssea ou alterar sua afinidade pela hidroxiapatite.

A principal limitação para o uso dos bisfosfonatos é a sua má absorção intestinal (0,7% a 10% da dose oral). A absorção intestinal ocorre, principalmente, no intestino delgado e piora com a presença de alimentos ingeridos concomitantemente. Por isso, a sua ingestão deve ser realizada em jejum ou duas horas longe das refeições. De 20% a 50% dos bisfosfonatos absorvidos ligam-se aos ossos, o restante é rapidamente excretado na urina.

Embora a meia-vida dos bisfosfonatos seja pequena, o tempo de permanência no organismo e nos ossos é longo, podendo durar dez ou mais anos, dependendo do tempo de remodelação do tecido ósseo.

A posologia habitual de alguns BPs é a seguinte:

- ✦ O alendronato pode ser usado na dose de 5 mg/dia para prevenção da osteoporose e de 10 mg/diariamente ou 70 mg uma vez por semana para o tratamento da osteoporose (Adami, 1994);
- ✦ O risedronato foi aprovado para prevenção e tratamento da osteoporose na dose de 5 mg/dia. Na doença de Paget, a dose preconizada do alendronato e do risedronato é de 40 e 30 mg/dia, respectivamente (Siris, 1981).
- ✦ O pamidronato pode ser utilizado para o tratamento da hipercalcemia e da doença de Paget na dose de 60 mg por infusão endovenosa, divididos em duas tomadas, com intervalos de uma semana (Altam, 1973).

1.1.6 Ação antitumoral dos bisfosfonatos

Várias pesquisas demonstraram que os BPs também possuem efeito em outras células além dos osteoclastos, incluindo células tumorais. Já existe uma quantidade considerável de dados *in vitro* demonstrando que os BPs têm ação citostática, induzem apoptose e inibem a adesão e a invasividade de células tumorais (Tabela 2), interferem no processo metastático, têm efeito na secreção de factores de crescimento e citoxinas e inibem a angiogénese tumoral (Green, 2000).

Tabela 2 – Trabalhos pré-clínicos sobre a ação anti-tumoral dos bisfosfonatos em linhagens de células tumorais (Vasconcellos *et al.*, 2003).

Autor	Linhagem	Propriedade anti-tumoral
Van der Pluijm <i>et al.</i> , 1996	Cancro da mama	Inibição da adesão celular
Boissier <i>et al.</i> , 1997	Cancro da mama e da próstata	Inibição da adesão celular
Shipman <i>et al.</i> , 1997, 1998	Mieloma Múltiplo	Indução da apoptose
Stearns, 1998	Cancro da próstata	Indução da invasividade celular
Aparicio <i>et al.</i> , 1998	Mieloma Múltiplo	Indução da apoptose
Tossone <i>et al.</i> , 2000	Miolema Múltiplo	Indução da apoptose
Fromigue <i>et al.</i> , 2000	Cancro da mama	Indução da apoptose
Boisser <i>et al.</i> , 2000	Cancro da mama e da próstata	Indução da invasividade celular
Senaratne <i>et al.</i> , 2000, 2002	Cancro da mama	Indução de apoptose
Jagdev <i>et al.</i> , 2001	Cancro da mama	Indução da apoptose
Sonnemann <i>et al.</i> , 2001	Osteossarcoma	Inibição da poliferação

Os resultados de uma série de estudos recentes revelam que os BPs possuem efeito anti-tumoral em diferentes tipos de neoplasias e que o mecanismo de ação destes fármacos também pode ser diverso, incluindo inibição da proliferação celular, indução de apoptose, inibição da adesão e da invasividade celular, inibição da angiogénese e efeitos na secreção de factores de crescimento e citocinas pelo micro-ambiente tumoral. Um entendimento mais profundo e completo sobre os mecanismos pelos quais os BPs influenciam o potencial metastático ou induzem a apoptose podem sugerir possibilidades terapêuticas novas e seletivas.

1.1.7 Obtenção de Bisfosfonatos

1.1.7.1 Síntese de Bisfosfonatos

A maioria dos BPs descritos atualmente na literatura com aplicações terapêuticas são hidroxibisfosfonatos. Outro grupo de bisfosfonatos com algum relevo é o grupo os aminobisfosfonatos.

A primeira síntese do hidroxibisfosfonato foi realizada por Von Baeyer e Hofmann (Von Baeyer, 1897; Lecouvey, 2000), e remonta ao ano de 1897. Estes investigadores sintetizaram e caracterizaram pela primeira vez o etidronato (Figura 8) a partir de agentes acilantes e fontes de fósforo (III); tendo este, constituído o primeiro derivado do ácido 1-hidroxibisfosfónico e serviu de incentivo para o desenvolvimento de outras vias sintéticas para a obtenção deste tipo de compostos (Von Baeyer, 1897).

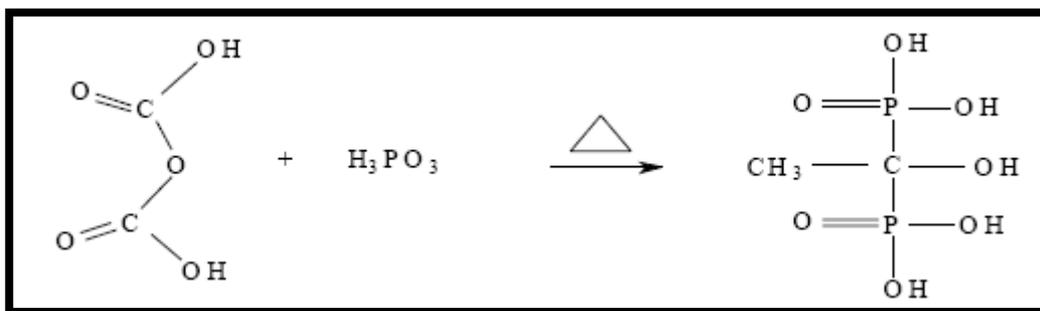


Figura 8 – Síntese do etidronato (adaptado de Wada, 1971).

São vários os processos descritos para a síntese dos BPs, embora sejam geralmente obtidos por dois métodos de síntese principais.

O método mais comum envolve a reação de um ácido carboxílico com o ácido fosforoso ou ácido fosfórico na presença de tricloreto de fósforo, seguida de hidrólise (Figura 9). Este método destaca-se pela simplicidade e baixo custo. Além disso, a presença de solvente não é um factor determinante para a evolução química da reação (Jaeggi, 1990; Kieczkowski, 1995; Lecouvey, 2000).

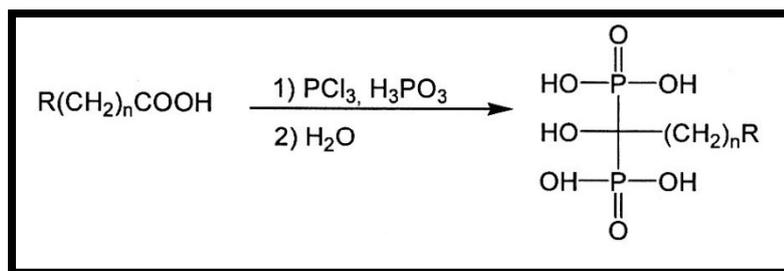


Figura 9- Método para obtenção de bisfosfonatos (adaptado de Kieczkowski, 1995).

Contudo, sendo eficiente para substratos alifáticos, este tipo de síntese requer condições ácidas fortes e altas temperaturas, tornando-se inútil em reações que envolvam reagentes sensíveis e substratos polifuncionais. Por outro lado, a mistura reacional inicial é formada por uma solução viscosa que é cada vez mais espessa à medida que a reação avança, inviabilizando a agitação a partir de um determinado ponto. Este factor torna o aumento de escala problemático. Para tentar ultrapassar este problema utilizam-se solventes inertes, como por exemplo o clorobenzeno (Bosies, 1998; Jaeggi, 1992; Guenin, 2004; Kieczkowski, 1995).

Uma modificação válida do processo para aplicação industrial foi conseguida por Kieczkowski (Kieczkowski, 1995), que ao utilizar no processo como solvente o ácido metanossulfónico, conseguiu manter o meio reacional fluído, obtendo-se assim uma maior percentagem de conversão do ácido carboxílico no respectivo ácido bisfosfónico. Esta alteração permite a obtenção de BPs de segunda geração partindo dos respectivos aminoácidos com bons rendimentos (por exemplo, o pamidronato e o alendronato) (Kieczkowski, 1995).

O primeiro método de síntese dos 1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos na forma éster, pela adição catalítica a um dialquilacilbisfosfonato, foi descrita em 1956 (McConnel, 1956). No entanto, seis anos mais tarde, estudos de ^{31}P e ^1H -RMN, demonstraram que os compostos sintetizados não eram 1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos na forma éster mas sim compostos isoméricos que continham duas ligações carbono-fósforo quimicamente diferentes (Fitch, 1962).

O outro método descrito na literatura (Lecouvey, 2000) envolve a síntese de tetraéster de bisfosfonatos por reações de Michaelis-Arbuzov a partir de um ataque inicial do trialquilfosfito a um cloreto de ácido, seguido do ataque nucleofílico do dialquilfosfito ao carbono electrófilo do α -cetofosfonato. Os tetraésteres de bisfosfonato podem então

sofrer desalquilação por hidrólise em meio ácido em HCl ou brometo de trimetilsililo seguida de metanólise (Lecouvey, 2000; Guenin, 2004). Este método (Figura 10) apresenta uma desvantagem, pois os tetraésteres de bisfosfonato são instáveis em condições básicas e térmicas (Lecouvey, 2001; Guenin, 2004).

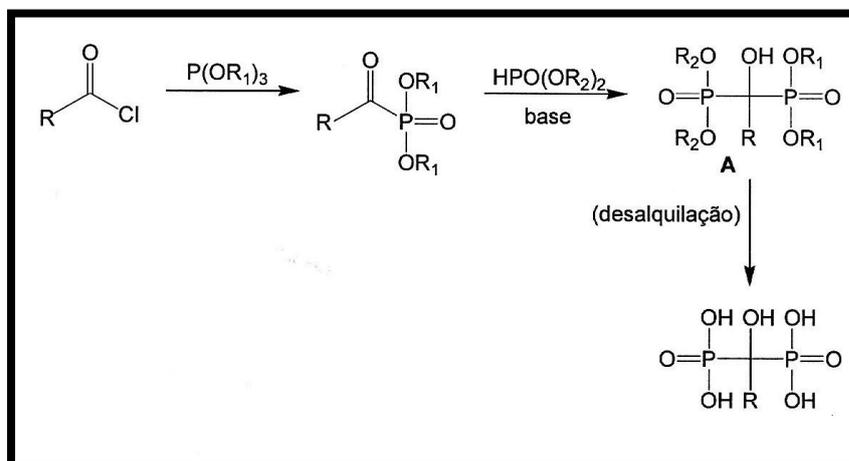


Figura 10- Método indirecto para obtenção de bisfosfonatos (adaptado de Lecouvey, 2000)

O tetraéster 1-hidroxi-1-metilbisfosfonato (Figura 10), que foi inicialmente estudado por McConnell e Coover (McConnell, 1956), encontra-se amplamente descrito na literatura (Turhanen, 2000; Bentzen, 1982; Ruel, 1995). Para além do processo de síntese já descrito, encontram-se outros como a reação de Michaelis-Becker (Figura 11) que permite a síntese num só passo do éster bisfosfónico. A síntese de 1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos pela adição de aniões de dialquilfosfito de potássio a cloretos de acilo já foi referida por Pudovik em 1963 (Pudovik, 1963). A reação do anião dialquilfosfito ao cloreto de acilo, a baixa temperatura, origina 1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos de tetraalquilo (Lecouvey, 2000). Esta reação envolve a formação de vários intermediários condensados, e só na presença de condições reacionais extremas é que se consegue a conversão dos reagentes no ácido bisfosfónico (Lecouvey, 2000; Ruel, 1995).

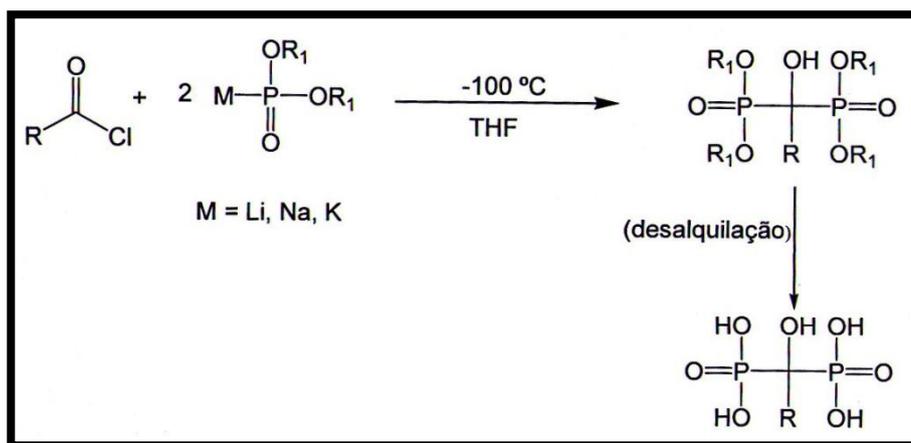


Figura 11- Reação de Michaelis-Becker para obtenção de bisfosfonatos (adaptado de Lecouvey, 2000).

Uma modificação recente destes métodos consiste na reação “one pot”, descrita por Lecouvey (Lecouvey, 2000; Lecouvey, 2001; Guenin, 2004), partindo de um cloreto de acilo e de tris(trimetilsilil)fosfito, com subsequente hidrólise em metanol. O interesse deste procedimento reside no facto de poder ser usado com substratos alifáticos e aromáticos e permitir a obtenção de ácidos bisfosfónicos com condições mais suaves e menos tempos de reação e com elevados rendimentos e grau de pureza (Guenin, 2004; Lecouvey, 2001) (Figura 12).

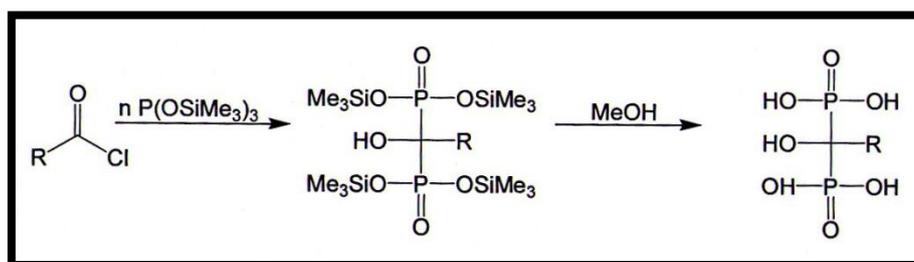


Figura 12- Método de Lecouvey para obtenção de ácidos bisfosfónicos (adaptado de Lecouvey, 2001).

1.1.7.2 Purificação dos Bisfosfonatos

A síntese de BPs é geralmente mais simples que a sua purificação. Apesar de os esquemas procedimentais serem aplicados com relativa facilidade, a obtenção final de um bisfosfonato puro e de cor branca é extremamente difícil.

Os BPs são compostos estáveis quando se encontram puros, mas decompõem-se rapidamente na presença de impurezas. Os bisfosfonatos não podem ser purificados por cromatografia, a única via disponível de separação e purificação é a precipitação, onde as impurezas ficam dissolvidas na solução e o precipitado fica rico em bisfosfonato.

Diversos métodos são encontrados na literatura, mas os mais recorrentes são a precipitação em misturas como água e metanol (Widle, 2002; Takeuchi, 1993) e água, metanol e acetona (Takeuchi, 1993). As lavagens em diversas soluções faz com que a obtenção dos bisfosfonatos puros seja demorada, pois apesar das reações levarem cerca de um dia a estarem completas, o processo de purificação pode levar diversos dias e provocar grandes perdas de composto.

1.1.7.3 Bisfosfonatos derivados do indazole

Os indazoles constituem uma importante classe de compostos heterocíclicos que apresentam propriedades biológicas interessantes, como anti-depressivas, anti-inflamatórias, analgésicas e anti-piréticas, anti-tumorais, anti-anémicas e atividades anti-HIV. O sistema aromático do indazole também está presente em diversos outros compostos como herbicidas, tintas e adoçantes. Apesar de todas as aplicações dos derivados de indazole, a química do próprio indazole mantém-se pouco estudada quando comparada com outros compostos heteroaromáticos como o indole ou o benzimidazole (Teixeira, 2006).

O indazole 1 (Figura 13) apresenta um sistema aromático heterocíclico, constituído por 10 electrões π , o qual pode ser descrito como resultante da fusão do anel benzénico com o anel pirazole nas posições C4/C5. Desta condensação resulta a diminuição da aromaticidade do núcleo do pirazole. O indazole apresenta características da piridina e do pirrole e a sua reatividade reflecte este comportamento duplo (Teixeira, 1999; Elguero, 1984; Teixeira, 2006).

O sexteto aromático do núcleo do pirazole do 1*H*-indazole é completado pela deslocalização do par de electrões do átomo de azoto N-1, como no pirrole. Consequentemente, este par de electrões não está disponível para a coordenação. Em contraste, o par de electrões do átomo de azoto N-2 não é necessário para completar o

sexteto de electrões aromáticos. Como na piridina, este par de electrões está disponível para coordenar no mesmo plano do heterociclo aromático formando complexos σ -coordenados sem perturbar a aromaticidade do anel (Teixeira, 1999; Elguero, 1984).

O anel de indazole contém dois átomos de azoto e apresenta tautomerismo anelar (Figura 13) correspondentes à ligação do NH que ocorre no átomo N-1 ou no átomo N-2. Devido à diferença em energia entre os tautómeros, o tautómero-1H predomina no estado gasoso, em solução e no estado sólido, e os seus derivados são usualmente mais estáveis termodinamicamente do que os derivados 2H correspondentes (Bouchet, 1977; Elguero, 1995; Teixeira, 2006; Schmidt, 2008), enquanto que os isómeros N-2 são favoráveis cineticamente (Teixeira, 2006; Schmidt, 2008).

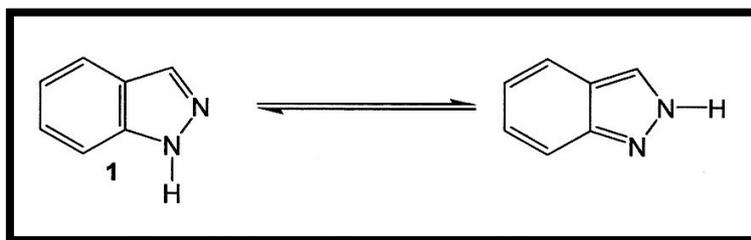


Figura 13 – Tautomerismo anelar do indazole 1.

Diversos estudos sobre a alquilação do 1H-indazole revelam que a acidez ou basicidade do meio, o uso de solventes próticos ou apróticos, ou os efeitos estereoquímicos e electrónicos afectam a razão entre isómeros alquilados N-1 e N-2 formados (Teixeira, 2006).

A espectroscopia do RMN é bastante útil para atribuir as estruturas dos isómeros N-1 e N-2 substituídas dos indazoles, pois os espectros de ^1H e ^{13}C -RMN dos dois isómeros são geralmente diferentes, capazes de serem utilizados como ferramentas de diagnóstico para estabelecer a posição em que se ocorre a substituição. A espectroscopia de ^{13}C -RMN é geralmente o melhor método para estabelecer esta atribuição (Teixeira, 2006; Schmidt, 2008).

1.2. Atividade biológica de novos compostos

1.2.1 Fármacos e ambiente

A evolução humana trouxe, de maneira direta e indireta, uma enorme gama de agentes poluentes aos cursos naturais de água, inclusive à parcela subterrânea do meio. Os fármacos representam um grupo de contaminantes ambientais emergentes com elevada persistência nos ambientes aquáticos. A presença destes compostos xenobióticos pode gerar uma série de efeitos adversos agudos e crônicos em organismos aquáticos.

Somente nos últimos anos a introdução dos fármacos no ambiente emergiu como um tópico importante da pesquisa (Daughton e Ternes, 1999; Kirsch *et al.*, 2003). Vários estudos, do meio da década de 1990 até hoje, têm-se concentrado na ocorrência e na distribuição dos fármacos humanos e veterinários no ambiente.

Atualmente são registradas 100.000 substâncias químicas diferentes na União Europeia, dos quais 30.000 destes produtos são comercializados em quantidades maiores que uma tonelada (Giger, 2002). Entre eles, estão os compostos farmacêuticos, que nos últimos anos foram classificados como contaminantes ambientais emergentes. O constante progresso da medicina faz com que novos medicamentos com novas substâncias activas sejam disponibilizados no mercado para o tratamento de animais e humanos. Os produtos farmacêuticos representam mais de 4.000 moléculas em 10.000 especialidades diferentes (Giger, 2002).

Os resíduos dos fármacos que são contaminantes do ambiente, incluem os seus metabolitos e conjugados, excretados principalmente na urina ou fezes. Estes compostos entram nos sistemas de tratamentos municipais de esgoto onde podem ser degradados, adsorvidos ao lodo do esgoto, ou diluídos eventualmente na água de superfície. Mesmo os fármacos que possuem tempo de meia-vida curtos são passíveis de causar exposições crônicas devido a sua introdução contínua no ambiente. Mesmo se a concentração de alguns fármacos encontrados no ambiente for baixa, a combinação deles pode ter efeitos pronunciados devido ao mecanismo de ação sinérgica (Reis *et al.*, 2007).

1.2.2 Ensaio de toxicidade

1.2.2.1 Considerações gerais

Toxicidade é a capacidade, inerente a um agente químico, de produzir danos aos organismos vivos, em condições padronizadas de uso. Uma substância muito tóxica causará dano a um organismo se for administrada em quantidades muito pequenas, enquanto que uma substância de baixa toxicidade somente produzirá esse efeito nefasto quando a quantidade administrada for muito grande (Sam, 1993).

Os efeitos da exposição aguda a uma substância química geralmente são diferentes dos que ocorrem depois da exposição subaguda ou crônica. A exposição aguda ocorre quando a dose for administrada de uma só vez. A exposição crônica tende a envolver quantidades pequenas da substância e períodos longos de tempo, geralmente levando à acumulação lenta do composto químico no organismo. A avaliação dos efeitos tóxicos cumulativos tem suscitado um grande interesse, em virtude da exposição crônica a concentrações baixas de várias substâncias químicas naturais encontradas no ambiente (Goodman, 2005).

O estudo da relação de dose-resposta ou de dose-efeito é extremamente importante para os toxicologistas, uma vez que têm como objetivo medidas de prevenção dos efeitos nocivos à saúde da exposição a uma agente químico. É necessário existir disponível uma medida quantitativa da relação entre a magnitude da exposição ao agente químico e o tipo e grau de resposta numa população exposta a esse agente. É somente com base nessa relação que se pode, seguramente, permitir uma dose tolerável do agente nocivo, em algum nível acima do zero, de tal modo que uma fração significativa do grupo exposto não experimente um indesejável efeito sobre a saúde

Existe uma relação de dose-resposta gradativa em determinado indivíduo e uma relação de dose-resposta quantica para a população. As doses gradativas de um fármaco administrado a determinado indivíduo geralmente levam ao aumento da magnitude da resposta à medida que a dose aumenta. Numa relação de dose-resposta quantica, a percentagem da população afetada cresce à medida que a dose aumenta, sendo uma relação quantica porque o efeito é especificado como presente ou ausente em determinado indivíduo. Este fenômeno de dose-resposta quantica é extremamente importante em toxicologia e usado para determinar a dose letal (DL50) dos fármacos e outros compostos químicos (Goodman, 2005).

1.2.2.2 Bioensaio utilizando *Artemia salina*

Artemia salina é uma espécie de microcrustáceo marinho da ordem Anostraca. É considerado um bioindicador devido ao seu reduzido e específico grau de tolerância a um determinado factor ambiental, de modo que apresente uma resposta nítida face a pequenas variações na qualidade do ambiente. Tem sido utilizada em testes de toxicidade devido à sua capacidade para formar cistos dormentes, fornecendo, desse modo, material biológico que pode ser armazenado durante longos períodos de tempo (superiores a seis meses) sem perda de viabilidade e sem necessidade de se manter culturas contínuas de organismos, além de ser uma espécie de fácil manipulação (Barbosa *et al.*, 2003).

O primeiro trabalho referente ao uso de *Artemia salina* em bioensaios foi publicado em 1956 e, a partir daí, inúmeros artigos têm sido reportados na literatura utilizando-se produtos e toxinas naturais, além de extratos de plantas, e tem sido proposto como teste padrão por Vanhaecke e Persoone (Cavalcante *et al.*, 2001).

Assim pelo facto do bioensaio de toxicidade com *Artemia salina* ser simples, rápido, sensível e barato, este consiste na estimativa da concentração de uma substância através da medida de uma resposta biológica, na qual existe apenas um parâmetro envolvido: vida ou morte. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade aguda e, portanto, é considerado como um bom bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica, sendo actualmente aceite pela comunidade científica (Cavalcante *et al.*, 2000).

As artémias são consideradas bons bioindicadores uma vez que se desenvolvem numa vasta gama de águas, desde salobra a ultrasalina. A sua elevada tolerância a uma larga gama de salinidade (10 a 120 g/L⁻¹), torna a artémia num animal relativamente fácil de manipular e estudar (Sam, 1993).

Os ovos apresentam uma cor castanha e um diâmetro de aproximadamente 0,20 mm, quando colocados em água salgada artificial eclodem entre as 24 e 48 horas originando um grande número de larvas. Estas pequenas larvas têm sido extensivamente usadas no estudo da toxicidade em muitas variedades de amostras (Rahman, 2001; Sam, 1993).

O estado larval mais comum ocorre entre as 24 e 48 horas após a sua eclosão, contudo o estudo da mortalidade das larvas em vários estados de desenvolvimento também tem sido usado experimentalmente (Rahman, 2001).

A artémia adulta mede em média 8 mm de comprimento podendo atingir 20 mm em condições ideais.

Outros fatores que influenciam o crescimento das artemias são o pH, a luz e o oxigénio dissolvido. O valor ideal de pH é de 8,0, já que para valores inferiores a 5,0 ou superiores a 10,0 a cultura morrerá. O pH da cultura pode ser aumentado com hidrogenocarbonato de sódio e diminuído com ácido clorídrico diluído. Outro factor que influencia o crescimento da cultura é a iluminação, podendo utilizar-se uma lâmpada normal do tipo “growlight”. Por fim, mas não menos importante, é a oxigenação da água.

1.2.3 Atividade Antioxidante

1.2.3.1 Radicais Livres

Para avaliar a importância da atividade antioxidante é essencial conhecer o mecanismo de formação de radicais livres e a subsequente degradação dos componentes dos sistemas biológicos. Os radicais livres, originados por ganho ou perda de um electrão ou mesmo por ruptura homolítica de uma ligação covalente, são espécies que contêm um ou mais electrões desemparelhados e, como tal, são altamente reativos (Madhavi *et al.*, 1997; Halliwell *et al.*, 1989).

A molécula de oxigénio é considerada um radical livre, na medida em que apresenta dois electrões desemparelhados localizados em diferentes orbitais antiligantes, permitindo-lhe reagir com outros radicais. Se um electrão é adicionado à molécula de oxigénio no estado fundamental, ele deve então entrar numa das orbitais antiligantes produzindo, deste modo, o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A adição de mais um electrão ao radical superóxido produz, então, o anião peróxido (O_2^{2-}).

Os radicais hidroxilo podem, também, ser formados diretamente a partir da reação do ião Fe^{2+} com o H_2O_2 . O radical hidroxilo é o radical mais reativo que se conhece, pois ataca e danifica quase todas as moléculas existentes nos sistemas biológicos (Halliwell, 1992).

As células são capazes de se defender contra os efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio (ROS) por mecanismos de defesa antioxidante. Em organismos aeróbios saudáveis, os níveis de ROS estão em equilíbrio com o sistema de defesa antioxidante. Entretanto, o desequilíbrio metabólico entre a produção de ROS e o sistema de defesa antioxidante caracteriza o stress oxidativo celular. Esse desequilíbrio pode ser causado pelos seguintes factores: a diminuição da defesa antioxidante causada por mutações nos enzimas de defesa, a diminuição da ingestão de vitaminas e outros constituintes na dieta, o aumento da produção de ROS causada por fatores ambientais (fumo, radiação, etc...), o excesso de atividade física, a ingestão de gorduras, o consumo de álcool, o *stress* físico e mental, inflamações e infeções, entre outros (Halliwell, 1992).

1.2.3.2 Antioxidantes

O estudo de antioxidantes é, nos dias de hoje, um campo essencial na síntese e estudo de compostos com atividade farmacológica (Halliwell, 1992; Mandel, 2004). Os antioxidantes têm um papel importante na prevenção e/ou desenvolvimento de várias patologias degenerativas. Por essa razão estão a decorrer estudos para determinar se os antioxidantes podem ser usados na medicina preventiva e na terapêutica, em muitas doenças incluindo doenças cardiovasculares, cancro, artrite, isquémia cerebral, doenças de Parkinson e de Alzheimer e mesmo no processo normal de envelhecimento.

Entende-se por antioxidante, o composto que é capaz de, em pequenas concentrações, quando comparadas com as do substrato oxidável, retardar ou prevenir significativamente a oxidação do substrato (Rice-Evans, 1996).

Na indústria alimentar os pigmentos e corantes são muito usados com o objetivo de melhorar a apresentação do alimento ao consumidor. Podendo ser de origem natural ou sintética, estes são utilizados na produção de alimentos e bebidas no intuito de garantir a uniformidade da cor e também de atribuir coloração àqueles originalmente incolores (Tocchini e Mercadante, 2001). Devido à crescente procura dos consumidores por produtos naturais, a substituição de corantes sintéticos por naturais tem-se tornado muito interessante na indústria alimentar (Mapari, 2009).

Na indústria alimentar, os antioxidantes naturais α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno e ácido ascórbico (vitamina C) e sintéticos BHA, BHT, *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ), são muito usados para aumentar a durabilidade dos produtos. Muitos destes compostos

têm outras funções importantes. Por exemplo, os antioxidantes fenólicos, tais como, BHA, BHT e TBHQ têm propriedades antimicrobianas (Mapari, 2009).

O ácido ascórbico, vitamina C hidrossolúvel, apresenta uma dualidade de efeitos (Figura 14). Pode atuar como antioxidante, interagindo rapidamente com radicais superóxido e hidroxilo, e como pró-oxidante, gerando radicais hidroxilo na presença de metais de transição.

A quercetina é um composto fenólico pertencente à classe dos flavonóides e apresenta uma potente atividade antioxidante (Figura 14). De facto os flavonóides estão largamente distribuídos pelo reino vegetal e são uma das classes mais importantes de compostos biologicamente ativos, apresentando atividade antioxidante, antibacteriana, antiviral, anticancerígena, imunoestimulante, hepatoprotetora e anti-inflamatória (Peterson, 1995; Middleton, 1994).

A maior atividade anti-radicalar da quercetina relativamente aos outros flavonóides é devida principalmente à presença de dois grupos hidroxilo em posição *orto* no anel fenólico, havendo outros fatores que contribuem em maior ou menor extensão para a sua atividade antioxidante (Yuting *et al.*, 1990; Lien *et al.*, 1999; Korkina e Afanas, 1997).

O ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel que pode ser sintetizado a partir da D-glicose ou D-galactose por plantas e muitas espécies de animais com exceção dos primatas e de certas aves, e por isso, ela deve ser adquirida pelo Homem a partir da dieta. Esta molécula pode ser oxidada reversivelmente ao ácido desidroascórbico pela perda de dois átomos de hidrogénio, na presença de iões metálicos, calor, luz ou em condições levemente alcalinas (pH acima de 6,0) com perda parcial da capacidade vitamínica (Ribeiro e Seravalli, 2004).

Por apresentar atividade antioxidante, a vitamina C é a primeira linha de defesa contra radicais derivados do oxigénio em meio aquoso. Esta vitamina reage diretamente com superóxidos, radicais hidroxilas e oxigénio singlete. Tem grande importância fisiológica devido a sua participação em diversos processos no organismo, como formação de tecido conjuntivo, produção de hormonas e anticorpos, biossíntese de aminoácidos e prevenção de escorbuto. É considerado um antioxidante fisiológico versátil, pois pode exercer ação nos compartimentos intra e extracelulares (Buettner e Schafer, 1997).

Relativamente ao BHT este é produzido a partir do cresol e do isobutileno. O seu uso foi patenteado e registrado no FDA em 1947 e 1954. O BHT reage com os radicais livres, retardando a oxidação e mantendo as características do material a proteger. Em relação ao BHT estudos toxicológicos têm demonstrado que os antioxidantes sintéticos apresentam efeito nocivo ao organismo. O BHT vem sendo relacionado ao desenvolvimento de doenças pulmonares (Hocman, 1988). A Figura 14 apresenta a estrutura química dos antioxidantes naturais (quercetina, ácido ascórbico e β -caroteno) e sintético (BHT) utilizados como padrões no presente estudo dos bisfosfonatos.

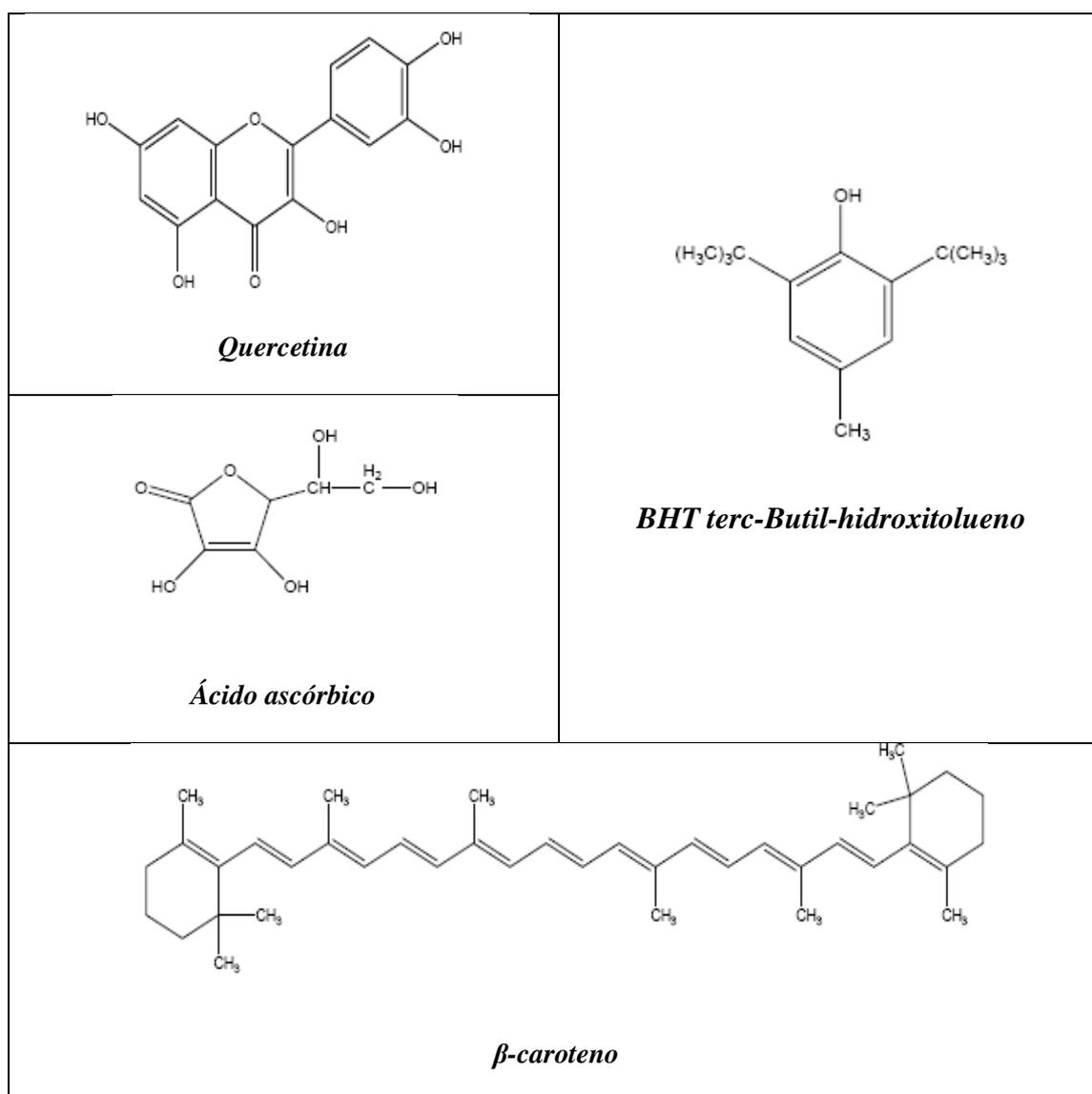


Figura 14 – Estrutura dos antioxidantes utilizados como padrões no presente estudo dos bisfosfonatos.

1.2.3.3 Determinação da atividade antioxidante

Nesse trabalho foi efetuada uma avaliação de actividade antioxidante por três métodos distintos.

1.2.3.3.1 Método do DPPH

O radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil ou DPPH[•] é um radical muito comum para a determinação da atividade antioxidante de alguns compostos.

Várias são as técnicas descritas para a determinação desta atividade. O radical DPPH[•] é solúvel em metanol, etanol ou DMSO; estas soluções apresentam coloração violeta e com um máximo de absorvência a $\lambda = 517$ nm. O método consiste na determinação por espectrometria de ultravioleta-visível, a este comprimento de onda, da diminuição de absorvência ao longo do tempo, devido à redução deste radical pelo composto antioxidante. Esta diminuição da absorvência traduz a maior ou menor capacidade anti-radicalar das substâncias em estudo, a qual é proporcional ao número de electrões captados.

A reação de redução do radical DPPH[•] é efetuada por captação de um átomo de hidrogénio dos compostos em estudo, formando um outro radical, e originando a forma reduzida DPPH-H, como se encontra na seguinte reação descrita em (1). Esta reação promove a alteração de coloração passando de violeta escuro a amarelo (Cheng *et al.*, 2003).



1.2.3.3.2 Método do β -caroteno/ Ácido linoleico

Os carotenóides são uma família de pigmentos sintetizados apenas por plantas e microrganismos. Nas plantas, desempenham função no mecanismo fotossintético e na proteção contra o dano causado por exposição à luz. Frutas e vegetais constituem a maior fonte de carotenóides na dieta humana, presentes como microcomponentes e responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha destes alimentos (Mangels *et al.*, 1993). Acredita-se que os carotenóides são os responsáveis pelas propriedades benéficas de frutas e vegetais na prevenção de doenças como cancro, doenças cardiovasculares e

determinadas doenças crónicas (Astrorg, *et al.*, 1997; Paiva, 1999). Mais de 600 carotenóides foram identificados na natureza. No entanto, aproximadamente 40 estão presentes na dieta humana. Destes 40, apenas 20 carotenóides têm sido avaliados em tecidos humanos. E 90% dos carotenóides presentes na dieta e tecidos humanos são representados pelo α -caroteno, β -caroteno, licopeno, luteína e criptoxantina (Rao, 2007).

O β -caroteno é um hidrocarboneto de cadeia longa com 96 átomos na sua composição que apresenta alternância de ligações duplas e simples ao longo da cadeia carbónica que liga as duas extremidades cíclicas presentes na molécula.

A determinação da atividade antioxidante pelo método do β -caroteno é baseada na perda da coloração amarela do β -caroteno em função da reação com os radicais formados pela oxidação do ácido linoleico na emulsão. A descoloração do β -caroteno é medida pelo decréscimo na absorvência inicial e mais lento na presença de um antioxidante. Este método é sensível devido à forte absorção do β -caroteno, porém é mais lento que o método do DPPH, uma vez que neste método a atividade antioxidante é avaliada pela capacidade de um extrato ou antioxidante inibir o processo de oxidação no sistema, num total de 2 horas (Koleva *et al.*, 2002).

Estudos evidenciaram o β -caroteno como o mais eficiente sequestrador de oxigénio singlete. O potencial antioxidante do β -caroteno deve-se ao número de ligações duplas conjugadas presentes na molécula, proporcionando a este composto alta reatividade química (Duarte-Almeida, 2006).

1.2.3.3.3 Avaliação do efeito protetor na hemólise do eritrócito

Os eritrócitos estão equipados com diversos mecanismos biológicos de defesa contra o *stress* oxidativo (Murakami, 2003), constituído por uma série de compostos antioxidantes que são capazes de prevenir a maioria dos efeitos adversos do *stress* oxidativo, principalmente os enzimas catalase, superóxido dismutase, glutatona redutase e glutatona peroxidase além de um sistema proteolítico que pode hidrolisar proteínas que sofreram oxidação (Murakami e Mawatari, 2003).

Os eritrócitos são particularmente susceptíveis à sobrecarga oxidante por estarem normalmente expostos a altas concentrações de oxigénio, terem uma membrana

susceptível à peroxidação lipídica, que delimita uma solução concentrada de uma proteína hémica - a hemoglobina - capaz de catalisar a lipoperoxidação, e por não terem capacidade de ressintetizar as biomoléculas lesadas. Existem evidências da produção de ROS no eritrócito pela reação de auto-oxidação da hemoglobina que gera O_2 podendo este originar, secundariamente, espécies mais reativas como o $HO\bullet$. Os danos oxidantes provocam a peroxidação lipídica e oxidação das proteínas eritrocitárias, processos eventualmente conducentes à hemólise (Murakami e Mawatari, 2003).

As ROS estão também apontadas como possíveis responsáveis pelo envelhecimento eritrocitário.

1.2.4 Atividade antimicrobiana

1.2.4.1 Considerações gerais

Os compostos antimicrobianos incluem as classes de antifúngicos, antibacterianos e antivirais com potencialidade ou já em uso na terapia clínica e na agricultura (Hardman *et al.*, 1996).

1.2.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos compostos é normalmente determinada por testes de difusão em meio sólido (Antibiograma) e por determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do composto para os microrganismos que lhe são sensíveis.

Os estudos de difusão em meio sólido baseiam-se na avaliação da difusão da substância em estudo num meio de cultura sólido inoculado previamente com um microrganismo, por medição do halo de inibição do crescimento, formado a partir do local de aplicação do composto em estudo (Naghetini, 2006).

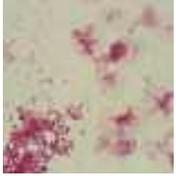
No método da difusão em disco, inocula-se uma suspensão padronizada do microrganismo na superfície do agar e os discos de papel contendo os produtos antimicrobianos em teste são colocados à superfície do meio de cultura. Este método baseia-se na avaliação da capacidade que o composto aplicado num disco de papel à superfície de um meio de cultura sólido, previamente inoculado com o microrganismo em estudo, apresenta para inibir o crescimento antimicrobiano. Durante a incubação, o agente antimicrobiano sofre difusão do disco de papel para o meio sólido. Um halo de inibição é formado em redor do disco, onde não ocorre crescimento de colónias

microbianas. O diâmetro do halo de inibição é proporcional à quantidade de agente antimicrobiano presente no disco, à solubilidade do agente, ao coeficiente de difusão no meio de cultura sólido e à eficácia global do agente antimicrobiano (Naghetini, 2006).

Os ensaios de atividade antimicrobiana em meio líquido são recomendados para a determinação da CMI, definida como a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo em tubos (macrodiluição) ou microplacas (microdiluição) (NCCLS, 2003). Nestes ensaios em meio líquido as substâncias a serem testadas são adicionadas em diferentes concentrações a um meio de cultura líquido, previamente inoculado com o microrganismo. Após incubação, o crescimento do microrganismo é determinado pela leitura visual direta ou turbidimétrica pelo uso de espectrômetro num comprimento de onda apropriado. A resposta do microrganismo é evidenciada pela turvação do meio (Naghetini, 2006). O método de macrodiluição é o método mais adequado para testar qualquer agente antibacteriano e antifúngico, sendo o método de referência para células bacterianas e leveduriformes, pelo NCCLS.

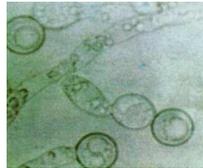
Neste estudo foram utilizadas algumas espécies bacterianas que são patogênicas para o homem, causando infecções do sistema respiratório, tracto gastrointestinal e urinário, nomeadamente, seis estirpes Gram – da família Enterobactereace (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella enteritidis*) e uma estipe Gram - da família Pseudomonaceae (*Pseudomonas aeruginosa*) e ainda 2 estirpes Gram + (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*). As principais características das bactérias em estudo estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3- Descrição das bactérias em estudo (Ferreira, 2000; Hogg, 2005).

Microrganismos		Descrição	Observação microscópica	
Família	Espécie			
Bactérias	Enterobacteriaceae (Forma de bacilo; na sua maioria são móveis)	<i>Morganella morganii</i>	São anaeróbios facultativos; facilmente identificáveis nas fezes; causam infecções do tracto urinário e pneumonia.	
		<i>Escherichia coli</i>	São anaeróbios facultativos; habitam o intestino humano; provocam pneumonia, meningite e gastroenterite.	
		<i>Proteus mirabilis</i>	São anaeróbios facultativos; provocam infecções urinárias e pneumonia.	
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	São anaeróbios facultativas; são bactérias encontradas na superfície da água; provocam infecção urinária e pneumonia.	
		<i>Salmonella enteritidis</i>	Causam patologias como gastroenterite e febre entérica.	
	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	São aeróbios; provocam infecções do sistema respiratório, infecções nos ossos e cartilagens.	
	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus aureus</i>	Têm forma esférica; causam infecções por pequenos cortes na pele, foliculite, endocardite e pneumonia, entre outras.	
Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	São anaeróbios facultativos; parasitas do intestino do homem; causam infecções intestinais e urinárias.		

No presente trabalho estudou-se a ação antifúngica dos compostos em estudo fase a alguns fungos leveduriformes patogénicos, cujas principais características estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4- Descrição das leveduras em estudo (Ferreira, 2000; Hogg, 2005).

Fungos	Saccharomycetaceae	<i>Geothricum klebahnii</i>	Presente na flora intestinal humana; conhecidas por Geotricose; podem causar infeções pulmonares, bronquite.	
		<i>Candida parapsilosis</i>	Leveduras patogénicas, pertencentes à divisão Ascomycota; responsáveis por infeções do sistema circulatório; causam doenças a nível do tracto gastrointestinal.	
		<i>Candida krusei</i>	Leveduras patogénicas; são responsáveis por infeções do sistema circulatório e infeções hematológicas.	
		<i>Candida albicans</i>	Provoca uma doença designada de candidíase que ocorre preferencialmente na pele ou em mucosas; responsáveis por infeções do sistema circulatório.	

2- Problemática e Objetivos

2.1 Problemática

Atualmente existe a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, com o principal objetivo de substituir ou aperfeiçoar os já existentes, de modo a obter menores efeitos adversos e baixos custos. Tal facto tem impulsionado a comunidade científica a novas e incessantes pesquisas nesta área.

A síntese orgânica tem contribuído significativamente neste aspecto, sendo responsável por cerca de 75% dos fármacos existentes no mercado farmacêutico.

Os bisfosfonatos (BPs) são fármacos utilizados como inibidores da reabsorção óssea e extensivamente aplicados no tratamento de várias doenças ósseas. São obtidos exclusivamente através de síntese química. Ao longo da última década tem havido um melhoramento na estrutura dos BPs de modo a sua atividade farmacológica possuir uma maior potência relativa e menores efeitos secundários associados, existindo três gerações de BPs. No sentido de aumentar a potência relativa e melhorar ou introduzir novas propriedades farmacológicas, têm-se investigado a incorporação de novas moléculas nos BPs, como o indazole. Os indazoles constituem uma importante classe de compostos heterocíclicos que apresentam propriedades biológicas interessantes, como anti-depressivas, anti-inflamatórias, analgésicas e anti-piréticas, anti-tumorais, anti-anémicas e atividades anti-HIV.

Neste trabalho pretende-se sintetizar novos bisfosfonatos derivados do indazole, nomeadamente BP3, BP2, BP4, e ainda avaliar os bisfosfonatos IP86, AF 31 e AD 8, de forma a conhecer estes compostos face ao alendronato (GABA-BP), um bisfosfonato já comercializado, relativamente às suas potenciais atividades antioxidante e antimicrobiana, e à sua toxicidade, a fim de tentar estabelecer uma relação entre a estrutura química e a atividade.

2.2 Objetivos gerais

Síntese de bisfosfonatos derivados do indazole e avaliar a sua atividade biológica *in vitro*, incluindo as propriedades antioxidantes, antimicrobianas e a toxicidade em *Artemia salina*.

2.3 Objetivos específicos

Sintetizar e purificar:

- ✦ Bisfosfonatos derivados do indazole.

Determinar:

- ✦ A estrutura dos compostos alvo através de métodos espectroscópicos (RMN).
- ✦ O rendimento de síntese dos compostos.
- ✦ A toxicidade aguda face à *Artemia salina*.
- ✦ As atividades antioxidantes dos compostos pelo método DPPH, sistema β -caroteno/ácido linoleico e efeito protetor da hemólise na membrana dos eritrócitos.

Quantificar:

- ✦ As atividades antioxidantes dos compostos pelo método DPPH, sistema β -caroteno/ácido linoleico, com determinação do IC50.
- ✦ A CL50 dos compostos em *Artemia salina*.
- ✦ A atividade antimicrobiana dos compostos, com determinação da CMI para as bactérias patogénicas Gram + e Gram -.

Comparar:

- ✦ Os rendimentos obtidos para a síntese dos BPs com a literatura.
- ✦ A atividade biológica e antioxidante entre os compostos sintetizados.
- ✦ A atividade biológica e antioxidante dos BPs derivados do indazole face ao alendronato (GABA-BP), um bisfosfonato já comercializado.

Avaliar:

- ✦ A atividade antioxidante dos BPs sintetizados.
- ✦ A atividade citotóxica para *Artemia salina*.
- ✦ A atividade antimicrobiana dos compostos face a bactérias patogénicas Gram + e Gram -.

3- Material e Métodos

3. 1 Síntese dos bisfosfonatos

3.1.1 Síntese do ácido [hidroxi-(1*H*-indazol-3-il)metileno]bisfosfónico BP2

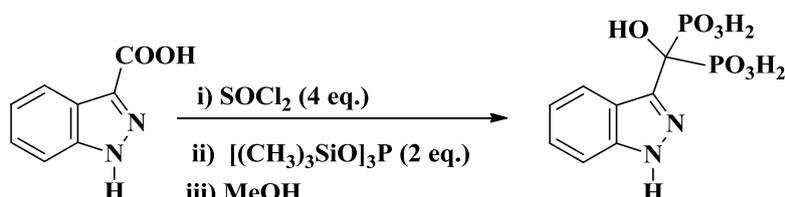


Figura 15 – Esquema da síntese do bisfosfonato designado como BP2

Dissolveu-se, sob aquecimento e agitação magnética 0,250 g de ácido indazole-3-carboxílico, em 3,0 mL de cloreto de tionilo (SOCl₂). Após duas horas de reação, evaporou-se o solvente e secou-se na linha de vácuo. Ao resíduo obtido, adicionou-se 5,0 mL de THF pré-seco e 1,0 mL de tris(trimetilsilil)fosfito ((CH₃)₃SiO)₃P), deixando a mistura reacional em agitação sob atmosfera de azoto. Após uma hora em agitação, evaporou-se o solvente e adicionou-se 5,0 mL de metanol (MeOH) permanecendo sob uma atmosfera de azoto.

O resíduo obtido foi purificado, adicionando-se-lhe éter e acetona, até a obtenção de um sólido branco, cujo rendimento foi 94,3%.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 7,01 (1H, t, *J*=7,5, ArH, 5-H), 7,30 (1H, t, *J*=8,1, ArH, 6-H), 7,45 (1H, d, *J*=8,4, ArH, 7-H), 8,28 (1H, d, *J*=8,1, ArH, 4-H).

3.1.2 Síntese do ácido [hidroxi(1-metil-1*H*-indazol-3-il)metileno]bisfosfónico BP3

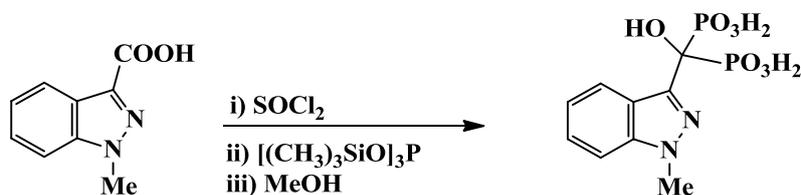


Figura 16 – Esquema da síntese do bisfosfonato designado como BP3.

Dissolveu-se, sob aquecimento e agitação magnética, 0,250 g de ácido 1-metilindazole-3-carboxílico, em 3,0 mL de cloreto de tionilo (SOCl₂). Ao fim de duas horas evaporou-se o solvente e secou-se na linha de vácuo. Adicionou-se 5,0 mL de THF pré-seco e 1,0 mL de tris(trimetilsilil)fosfíto ((CH₃)₃SiO)₃P, deixando a mistura reacional em agitação sob atmosfera de azoto. Após uma hora em agitação, evaporou-se o solvente e adicionou-se 5,0 mL de metanol (MeOH) permanecendo sob uma atmosfera de azoto.

O resíduo obtido foi purificado, adicionando-se-lhe éter e acetona, até à obtenção de um sólido branco, cujo rendimento foi 87,68%.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 4,02 (3H, s, NCH₃), 7,05 (1H, t, *J*=7,5, ArH, 5-H), 7,35 (1H, t, *J*=8,1, ArH, 6-H), 7,54 (1H, d, *J*=8,4, ArH, 7-H), 8,29 (1H, d, *J*=8,1, ArH, 4-H).

3.1.3 Síntese do ácido 1-hidroxi-2-(1H-indazol-1-il)etano-1,1-di-il]bisfosfónico BP4

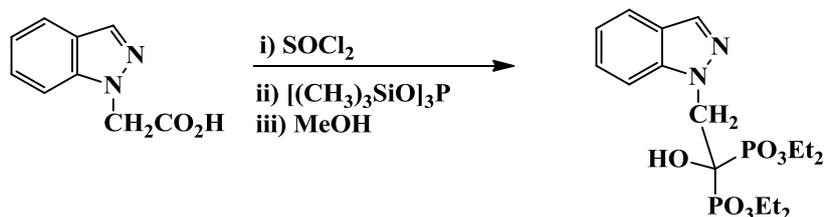


Figura 17 – Esquema da síntese do bisfosfonato designado como BP4.

Dissolveu-se, sob aquecimento e agitação magnética 0,250 g de ácido 2-indazoleacético, em 3,0 mL de cloreto de tionilo (SOCl₂). Após duas horas, evaporou-se o solvente e secou-se na linha de vácuo. Adicionou-se 5,0 mL de THF pré-seco e 1,0 mL de tris(trimetilsilil)fosfito ((CH₃)₃SiO)₃P), deixando a mistura reacional em agitação sob atmosfera de azoto. Após uma hora, evaporou-se o solvente e adicionou-se 5,0 mL de metanol (MeOH) permanecendo sob uma atmosfera de azoto.

O resíduo obtido foi purificado, adicionando-se-lhe éter e acetona, até a obtenção de um sólido branco, cujo rendimento foi 95,68 %.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 4,85 (2H, t, *J*_{H,P}=10,2, NCH₂C(OH)(PO₃H₂)₂), 7,12 (1H, t, *J*=7,2, ArH, 5-H), 7,37 (1H, dt, *J*=7,2 e *J*=0,9, ArH, 6-H), 7,61 (1H, d, *J*=8,1, ArH, 7-H), 7,74 (1H, d, *J*=8,1, ArH, 4-H), 8,12 (1H, d, *J*=0,6, 3-H).

3.1.4 Outros bisfosfonatos utilizados

Foram ainda utilizados ao longo deste trabalho os compostos ácido [1-hidroxi-3-(1*H*-indazol-1-il)propane-1,1-di-il]bisfosfónico (IP86), ácido [1-hidroxi-2-(4-fluoro-1*H*-indazol-1-il)etano-1,1-di-il]bisfosfónico (AF31), ácido [1-hidroxi-2-(5-nitro-1*H*-indazol-1-il)etano-1,1-di-il]bisfosfónico (AD8) e o ácido (1-hidroxi-4-aminobutano-1,1-di-il)bisfosfónico (GABA-BP), usado como padrão, cedidos pela Doutora Fátima Teixeira, do LNEG (ex-INETI).

3.2 Determinação da toxicidade utilizando o crustáceo *Artemia salina*

3.2.1 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi uma solução salina que apresenta na sua composição 26,4 g de NaCl, 0,84 g de KCl e 0,17 g de NaHCO₃.

Contudo devido às características químicas dos compostos sintetizados, como é o caso da forte interação com os catiões divalentes cálcio (Ca²⁺) e magnésio (Mg²⁺) foi necessária uma adaptação do meio para os compostos em estudo.

Os cistos de *Artemia salina* foram colocados a eclodir em meio salino, na ausência de luz, a 24°C, durante 48 horas.

3.2.2 Procedimento

O ensaio foi realizado em placas contendo 24 poços, onde se colocou 900µL de meio salino e 100 µL de amostra em cada poço da placa. Aplicou-se 10 artémias em cada poço da placa; fez-se 6 replicados por concentração.

Posteriormente incubou-se a placa na ausência da luz, a 25°C, durante 24 horas e efectuou-se a contagem do número de artémias mortas em cada um dos poços, a fim de quantificar o grau de sobrevivência.

3.2.3 Preparação das soluções dos bisfosfonatos

Para cada bisfosfonato sintetizado foram preparadas soluções com diferentes concentrações nomeadamente 3000, 2000, 1500, 750, 500, e 250 mg/L, obtidas utilizando uma solução tampão fosfato (pH 7.0).

Neste bioensaio utilizou-se o dicromato de potássio nas concentrações 10, 18, 32, 56 e 100 µg/L, como controlo positivo e uma solução de água do mar (meio salino) como controlo negativo. Também se testou o tampão fosfato, dado ser o solvente onde são preparadas as diferentes concentrações dos bisfosfonatos.

Tabela 5- Concentrações dos compostos utilizados no bioensaio com *Artemia salina*.

Bisfosfonatos			
BP2, BP3, BP4, GABA-BP		K ₂ CrO ₄	
[solução] (mg/L)	[ensaio]µg/mL	[solução] (mg/L)	[ensaio]µg/mL
3000	300	100	10
2000	200	180	18
1500	150	320	32
1000	1000	560	56
750	75	1000	100
500	50		
250	25		

Foram elaborados curvas dose-respostas com o auxílio do programa OriginPro 8.

3.3 Determinação da atividade antioxidante

Para a avaliação da atividade antioxidante dos BPs foram utilizadas três metodologias distintas:

- pelo método do radical DPPH que tem por base a reação que envolve o radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), em que os compostos com potencial antioxidante reagem com o radical livre DPPH e produzem a 1,1-difenil-2-picril-hidrazina.
- pelo método do método do β-caroteno/ ácido linoleico, que se trata de um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação do β-caroteno induzida pelos produtos da

degradação oxidativa do ácido linoleico, ou seja, este método avalia a atividade de formação de radicais livres que são originados durante a peroxidação do ácido linoleico. - pelo método do efeito protetor da hemólise do eritrócito, que visa a avaliação da percentagem de hemólise e de meta-hemoglobina formada, havendo indução de *stress* no eritrócito inicialmente, onde se pretende verificar se os BPs ajudam a exercer um efeito protetor no ericrócito.

3.3.1 Método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

O estudo da avaliação da atividade antioxidante nos compostos sintetizados foi determinado quantitativamente através de um método fotométrico no qual a redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (0,1mM) é quantificada por espectrofotometria de UV/vis a 490 nm (Choi *et al.*, 2002; Teppe *et al.*, 2007; Duarte-Almeida *et al.*, 2006).

O ensaio foi realizado em microplaca e em cada poço colocaram-se 30 µL de amostra, aos quais foram adicionados, 200 µL de uma solução metanólica de DPPH (0,1mM).

A leitura da absorvência foi realizada a 490 nm, após 30 min de reação à temperatura ambiente e na ausência total de luz. Preparou-se um branco, utilizando metanol em vez de composto. A análise foi feita em triplicado para cada amostra.

A percentagem % de inibição da formação de radicais livres foi determinada correlacionando o decréscimo da absorvência das amostras com a absorvência do branco, de acordo com a seguinte expressão matemática:

$$\% I = \frac{Abs_{490} (Branco) - Abs_{490} (Amostra)}{Abs_{490} (Branco)} \times 100$$

Efetuuou-se uma curva de calibração com soluções de ácido ascórbico, BHT e quercetina, no intervalo de concentrações compreendido entre 1 e 150 µg/mL.

A atividade antioxidante foi expressa em µg equivalentes de ácido ascórbico e quercetina por mL.

Uma forma usual de expressar os resultados do ensaio é calcular a concentração de composto capaz de provocar 50% de inibição de oxidação, denomina-se IC50.

Os padrões foram preparados em etanol, sendo que para o padrão BHT foram testadas concentrações entre 1 e 150 µg/mL, para a quercetina entre 6,25 e 100 µg/mL e para o ácido ascórbico foram testadas concentrações entre 1 e 100 µg/mL.

3.3.2 Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β- caroteno/ácido linoleico

A avaliação da atividade antioxidante foi igualmente realizada por meio de um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação do β caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa de um ácido gordo (ácido linoleico), método desenvolvido por Marco (1968) e modificado por Miller (1971).

Foi utilizado como substrato uma emulsão de β-caroteno e ácido linoleico. A solução *stock* foi preparada adicionando-se-lhe 0,5 mg de β-caroteno diluído em clorofórmio (1 mL), ao qual se juntou 25 µL de ácido linoleico e 200 mg de *Tween* 40 (utilizado como emulsionante). Posteriormente, o clorofórmio foi evaporado no rotavapor e seguidamente foi adicionada 100 mL de água destilada (água destilada previamente saturada em O₂, durante 30 minutos com agitação vigorosa). Aplicou-se em microplaca 35 µL da amostra e 250 µL de solução de β-caroteno/ácido linoleico, e fez-se leitura da absorvência do tempo zero (T0) a 490 nm.

As microplacas foram posteriormente colocadas em banho-maria a 50°C e as leituras subsequentes foram realizadas após 2 horas. Os padrões utilizados foram o BHT, a quercetina e o ácido ascórbico, tendo sido preparadas soluções em etanol. Os brancos foram preparados contendo 250 µL de solução *stock* e 35 µL de DMSO.

Para o cálculo das percentagens de inibição da oxidação, foram utilizados os seguintes cálculos:

$$\Delta\text{Branco} = \text{Abs } 490 \text{ nm T0h} - \text{Abs } 490 \text{ nm T2h}$$

$$\Delta\text{Amostra} = \text{Abs } 490 \text{ nm T0h} - \text{Abs } 490 \text{ nm T2h}$$

$$\%I = (\Delta\text{Branco} - \Delta\text{Amostra}) / \Delta\text{branco} \times 100$$

Como no método anterior os padrões foram preparados em etanol, sendo que para o padrão BHT foram testadas concentrações entre 1 e 150 µg/mL, para a quercetina entre 6,25 e 100 µg/mL e para o ácido ascórbico foram testadas concentrações entre 1 e 100 µg/mL.

3.3.3 Avaliação do efeito protetor na hemólise do eritrócito

Esta técnica permite avaliar qual o efeito que os compostos sintetizados (BPs) exercem na proteção do eritrócito quando este é submetido a *stress*. Deste modo podemos verificar qual o potencial antioxidante dos compostos.

3.3.3.1 Preparação e tratamento das suspensões de eritrócitos

Neste método utiliza-se o sangue de rato Wistar retirado por punção cardíaca. Após a recolha do sangue, este é colocado em tubos heparinizados. Seguidamente efetua-se uma centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C, após a qual o sobrenadante é removido. Ressuspende-se os eritrócitos em tampão fosfato de sódio 25 mM (pH=7,4) em NaCl 0,9% (p/v). As células são lavadas submetendo-as a duas centrifugações sucessivas, retirando sempre o sobrenadante. Posteriormente é ressuspendido os eritrócitos em tampão de fosfato de sódio 25 mM (pH=7,4) em NaCl 0,9% (p/v), de modo a obter uma percentagem final dos eritrócitos de 5% (v/v). As suspensões eritrocitárias são incubadas a 5% com azida de sódio 2 mM durante 60 minutos a 37°C, afim de inibir a atividade da catalase.

3.3.3.2 Incorporação dos bisfosfonatos nos eritrócitos

Esta etapa tem como objetivo estudar a penetração dos compostos no eritrócito e os seus eventuais efeitos antioxidantes.

As suspensões são incubadas durante 15 minutos com o flavonóide quercetina (controlo positivo), e com as amostras de BPs na concentração final de 25 µM. É efetuado um ensaio adicionando-se apenas etanol na percentagem de 0,5 %. As misturas reacionais

são centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C, seguidamente é retirado o sobrenadante, de modo a remover tudo o que não é incorporado nos eritrócitos. O sedimento celular constituído pelos eritrócitos é ressuspensionado com tampão fosfato de sódio a 10 mM (pH=7,4) em NaCl 0,9%, e é novamente centrifugado nas mesmas condições. Ressuspende-se em igual volume de tampão fosfato de sódio 25 mM (pH=7,4) em NaCl 0,9% (p/v). As suspensões eritrocitárias são posteriormente expostas ao estímulo oxidante.

Às suspensões eritrocitárias é-lhe adicionado cloreto de cobre, preparado no próprio dia, na concentração final de 200 µM. As misturas são seguidamente incubadas a 37°C com agitação constante. Retiram-se as amostras aos tempos 0, 90, 180 e 270 minutos e estas são analisadas por duas técnicas: determinação da hemólise e da meta-hemoglobina.

Na preparação das amostras é retirado 0,5 mL de cada amostra incubada e adicionado 4,5 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM (pH=7,4), em NaCl 0,9% (p/v) para obtenção das suspensões eritrocitárias. Seguidamente são centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Em seguida determina-se a percentagem de hemólise no sobrenadante e de meta-hemoglobina no sedimento.

A percentagem de hemólise é calculada espectrofotometricamente com base na absorvência do heme libertado a 409 nm. A absorvência a 409 nm é equivalente para a oxi-hemoglobina e produtos da oxidação da hemoglobina, usando-se por isso este comprimento de onda para determinação da hemólise. A leitura do sobrenadante é feita a 409 nm e posteriormente diluem-se os sobrenadantes, adicionando-se 9,9 mL de água destilada a 0,1 mL de amostra reacional e lê-se a absorvência a 409 nm; este valor corresponde a 100% de hemólise.

A fórmula utilizada para o cálculo da hemólise, expressa percentualmente, é a seguinte:

$$\% \text{ Hemólise} = \text{Abs}_{409 \text{ nm}} \text{ sobrenadante} / \text{Abs}_{409 \text{ nm}} \text{ dil} \times 100$$

O sedimento é hemolisado pela adição de 0,6 ml de água desionizada, é centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Seguidamente é colocado numa *cuvette* água desionizada e adiciona-se o sobrenadante gota-a-gota, de forma a obter um valor de

absorvência de 0,180 a 525 nm (ponto isobéptico da oxi-hemoglobina e da meta-hemoglobina). A este comprimento de onda, obtém-se o valor da hemoglobina total. Efectua-se em seguida, a leitura da absorvência a 630 nm, comprimento de onda em que apenas a meta-hemoglobina absorve significativamente.

O cálculo da percentagem de meta-hemoglobina presente é feito a partir da relação entre as concentrações de meta-hemoglobina e de hemoglobina total, segundo a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Meta-Hemoglobina} = (\text{Abs}_{630 \text{ nm}} / \text{Abs}_{525 \text{ nm}})$$

3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

Procedeu-se à avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos BPs em estudo. Tendo sido testado também a atividade antimicrobiana para o bisfosfonato alendronato (GABA-BP), e para o DMSO, uma vez que foi o solvente para a preparação dos compostos.

A solução inicial de BPs foi de 10 mg/mL que foi dissolvida em DMSO 1:2 (água) para o estudo da actividade pelo método de Difusão em meio sólido. Aplicou-se 5 µL em cada disco, a quantidade aplicada de BPs por disco foi de 50 µg. Como controlo utilizou-se o DMSO (5 µL/disco).

No ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido, com determinação da CMI, foram utilizadas soluções com as seguintes concentrações 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 mg/mL em DMSO. Como se fez uma diluição de 1/20 (100µL de cada solução para um volume final de 2mL, as concentrações finais dos BPs foram de: 31,5; 62,5; 125; 500; 1000 µg/mL. Os controlos positivo e negativo foram preparados colocando 100 µL de DMSO em substituição das soluções de BPs.

3.4.1 Microrganismos testados

Os microrganismos testados foram as bactérias patogénicas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Enterococcus faecalis, *Staphylococcus aureus* e os fungos leveduriformes *Geotrichum klebatini*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida albicans*.

As estirpes patogénicas em estudo foram isolados clínicos cedidas pelo Laboratório Flaviano Gusmão Lda. Évora.

3.4.2 Preparação do inóculo

Os microrganismos foram armazenados em tubos de ensaio rolhados contendo o meio de cultura adequado, designados por “rampas de crescimento”, onde a cultura é incubada em condições óptimas de crescimento para o microrganismo. Os tubos são armazenados a 4°C durante 1 a 2 meses, dependendo do microrganismo a conservar.

O inóculo foi preparado a partir de culturas recentes dos microrganismos em estudo. Com o auxílio de uma ansa estéril, preparam-se suspensões em soro fisiológico (NaCl 0,9%) cuja concentração é ajustada a 0,5 na escala McFarland.

A escala de McFarland mede o grau de turvação da suspensão bacteriana por comparação com uma solução de cloreto de bário. Os valores da escala de McFarland variam entre 0 e 5 unidades. O valor da escala de McFarland indicado para estudos de atividade antibacteriana em meio sólido (antibiogramas) é 0,5 para bactérias e leveduras (correspondente a 10^8 UFC/mL). Se a concentração do inóculo for elevada pode ocorrer má difusão do antimicrobiano e aparecer uma zona de inibição demasiado grande, e se a concentração do inóculo for ideal a difusão do antimicrobiano é correcta e o disco tem mais possibilidade de ficar envolvido por uma zona de inibição bem definida. Utilizaram-se discos de antibióticos comerciais como controlo. Os ensaios foram efetuados em triplicado.

3.4.3 Método de difusão em meio sólido

Neste estudo procedeu-se à preparação dos meios de cultura adequados para os microrganismos em estudo: SDA (Sabouraud Dextrose Agar) (Merck) para leveduras e NA (Nutrient Agar) (Merck) para bactérias. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C/15min e armazenados à temperatura ambiente. Posteriormente, procedeu-se à liquefação dos meios e distribuição em placas de Petri.

As placas contendo os meios de cultura apropriados são inoculadas, por espalhamento, com 10 µL de inóculo. Após a absorção do inóculo no meio de cultura, com a ajuda de uma pinça estéril, colocaram-se três discos de papel Whatman estéril (Ø 6 mm) de modo equidistante em cada uma das placas. Para cada um dos microrganismos, procedeu-se à aplicação 5 µL de cada um dos compostos em estudo.

Como controlo positivo, para os estudos de atividade antifúngica, utilizou-se a nistatina (concentração 33µg), correspondente à dose terapêutica (1000 UI) e para os estudos de atividade antibacteriana utilizaram-se discos de antibióticos específicos para cada uma das estirpes estudadas de acordo com as normas NCLSS (2003). Como controlo ou testemunha, para cada um dos microrganismos, prepararam-se placas, contendo o inóculo e aplicaram-se discos de papel Whatman estéril, testemunho do crescimento natural dos microrganismos. Os ensaios foram efetuados em duplicado.

Após incubação das placas numa estufa a 37°C durante 24h e 48h para os ensaios antibacterianos e anti-leveduriformes, respetivamente, procedeu-se à observação das placas para avaliação do diâmetro dos halos de inibição formados (mm) e da uniformidade no crescimento bacteriano. As leituras foram interpretadas de acordo com os critérios de interpretação recomendados pelo NCCLS, por comparação com antibióticos padrão.

3.4.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Neste estudo procedeu-se à preparação dos meios de cultura líquidos: SDB (Sabouraud Dextrose Broth) (Merck) para leveduras e NB (Nutrient Broth) (Merck) para bactérias. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos e armazenados à temperatura ambiente.

Para determinação do valor de CMI, preparam-se soluções em tubos de ensaio estéreis, com 900 µL de meio de cultura, 100 µL de solução de cada um dos BPs em DMSO e 1000 µL inóculo, para cada uma das concentrações de BPs em estudo e para cada microrganismo.

Como controlo positivo, preparou-se uma mistura de 100 µL de DMSO, 900 µL de meio de cultura e 1000 µL de inóculo. Como controlo negativo preparou-se uma

solução contendo 100 μL DMSO, 900 μL de meio de cultura e 1000 μL de soro fisiológico.

As suspensões microbianas foram incubadas em agitador orbital a 37°C durante 24h e 48h, para a cultura de bactérias e leveduras, respetivamente.

4- Resultados e Discussão

4.1 Síntese dos compostos

O presente trabalho visou a síntese de bisfosfonatos derivados do indazole. O procedimento de síntese utilizado foi baseado no método descrito por Leucouvey (Lecouvey *et al.*, 2000).

A reação baseia-se na preparação dos cloretos de acilo *in situ*, por reação dos ácidos carboxílicos com o cloreto de tionilo. Posteriormente o cloreto de acilo reage com tris(trimetilsilil)fosfito e logo após ocorre a metanólise. Os BPs são obtidos com a evaporação da fração volátil (Figura 18).

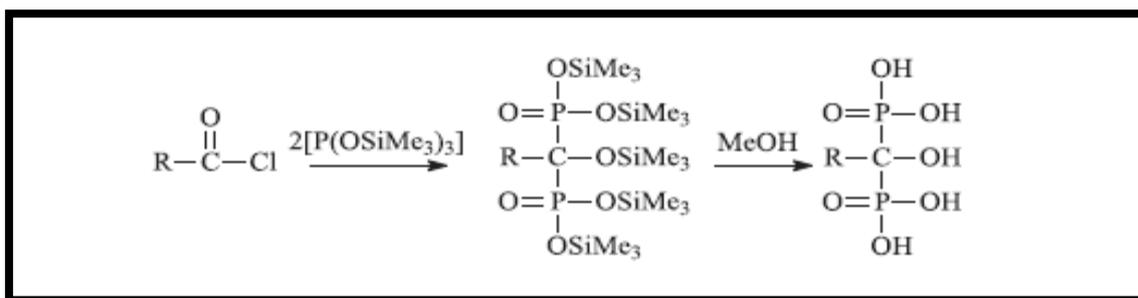


Figura 18- Síntese de BPs por meio da reação entre o cloreto de acilo e o tris(trimetilsilil)fosfito (adaptado de Leucouvey *et al.*, 2001).

Esta reação possui inúmeras vantagens destacando-se: condições mais brandas do sistema reacional, maiores rendimentos obtidos e menores tempos de reação. Por outro lado, observam-se algumas desvantagens: alto preço do reagente tris(trimetilsilil)fosfito e dificuldade de se encontrar comercialmente diferentes cloretos de acilo (sendo necessária a preparação dos mesmos) (Leucouvey, 2001).

A preparação de cloretos de acilo é bastante conhecida na literatura e consiste na reação entre um ácido carboxílico e o cloreto de tionilo (Figura 19). Entretanto, isso representa uma nova etapa na síntese dos BPs, acarretando, principalmente, redução do rendimento total e dispêndio de tempo.

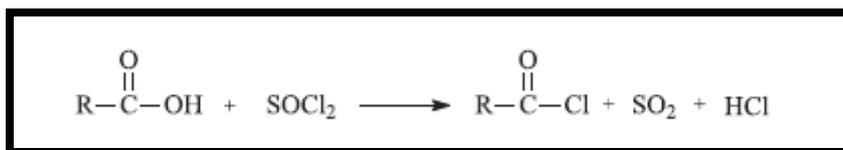


Figura 19- Síntese de cloretos de acilo (adaptado de Vogel, 1951).

Os compostos sintetizados apresentaram o seguinte rendimento: BP2 $\eta=94,30\%$, BP3 $\eta=87,68\%$ e o BP4 $\eta=95,68\%$, similares aos descritos na literatura (Teixeira, 2009; Teixeira, F.C., Teixeira, A.P.S., manuscrito em preparação)

Os compostos sintetizados foram BP2, BP3 e BP4 (Figura 20), os quais foram caracterizados e identificados por ^1H RNM (Teixeira, 2009; Teixeira, F.C., Teixeira, A.P.S., manuscrito em preparação).

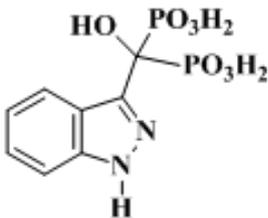
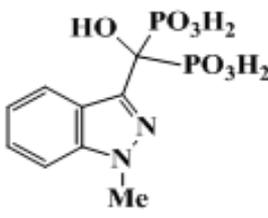
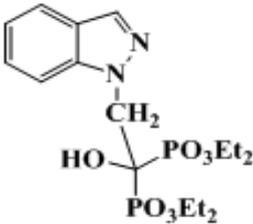
Estrutura química dos compostos sintetizados	
 <p>ácido [hidroxi-(1<i>H</i>-indazol-3-il)metileno]bisfosfônico</p> <p>BP2</p>	 <p>ácido [hidroxi(1-metil-1<i>H</i>-indazol-3-il)metileno]bisfosfônico</p> <p>BP3</p>
 <p>ácido 1-hidroxi-2-(1<i>H</i>-indazol-1-il)etano-1,1-di-il]bisfosfônico</p> <p>BP4</p>	

Figura 20- Estrutura química dos compostos sintetizados e utilizados no estudo.

Para além dos BPs sintetizados foram utilizados outros BPs nos ensaios de avaliação da atividade biológica e antioxidante, a sua estrutura química encontra-se nas Figura 21 e 22.

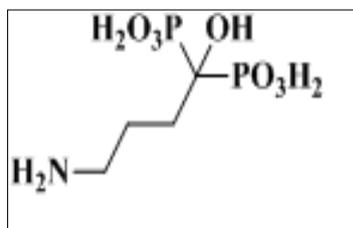


Figura 21- Estrutura química do Alendronato (GABA-BP), bisfosfonato comercial, utilizado como controlo.

Estrutura química dos restantes BPs utilizados	
<p>Ácido [1-hidroxi-3-(1<i>H</i>-indazol-1-il)propane-1,1-di-il]bisfosfónico</p> <p>IP86</p>	<p>Ácido [1-hidroxi-2-(4-fluoro-1<i>H</i>-indazol-1-il)etano-1,1-di-il]bisfosfónico</p> <p>AF-31</p>
<p>Ácido [1-hidroxi-2-(5-nitro-1<i>H</i>-indazol-1-il)etano-1,1-di-il]bisfosfónico</p> <p>AD-8</p>	

Figura 22 - Estrutura química dos outros BPs utilizados no estudo.

A estrutura do bisfosfonato influencia diretamente a sua propriedade anti-reabsortiva; esta dependente de duas propriedades estruturais distintas. A estrutura central P-C-P e o grupo R_1 são determinantes para a maior ou menor afinidade do composto à hidroxiapatite, componente mineral do osso, enquanto a cadeia R_2 é responsável pela ação biológica destes compostos (Pecherstorfer, 2000). Neste estudo a cadeia R_1 é sempre um grupo OH e a cadeia R_2 possui sempre um anel de indazole substituído em diferentes posições e com cadeia lateral com diferentes dimensões.

Os compostos que contêm um átomo de azoto primário, como por exemplo o alendronato, são mais potentes que os BPs que não apresentam átomos de azoto na sua constituição. Os BPs que contêm átomos de azoto num ciclo, têm apresentado ainda maior atividade.

Assim, procedeu-se à síntese deste novo grupo de compostos, os bisfosfonatos derivados do indazole. Como a própria estrutura do indazole apresenta dois átomos de azoto no anel aromático, é expectável que os compostos apresentem elevada potência comparados aos atuais.

4.2 Avaliação da Atividade Antioxidante

Na determinação da atividade antioxidante *in vitro*, utilizaram-se distintas metodologias descritas na literatura, nomeadamente o método 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), metodologia descrita por Brand-Williams e Berset (1995), e o sistema β -caroteno/ácido linoleico método desenvolvido por Marco (1968) e modificado por Miller (1971), que emprega lípidos como substrato, baseando-se na descoloração do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico.

4.2.1 Método do radical DPPH

Na avaliação da atividade antioxidante por este método, o radical livre DPPH^{*} reage com o antioxidante, convertendo-se à sua forma reduzida. Nessa reação, a solução metanólica de DPPH, inicialmente de coloração violeta, torna-se amarela (Figura 23); o

grau de descoloração é monitorizado através do espectrofotómetro, indicando deste modo a capacidade do antioxidante em sequestrar o radical livre.

A reação de redução do radical DPPH[•] é efetuada por captação de um átomo de hidrogénio dos compostos em estudo, formando um outro radical, e originando a forma reduzida DPPH-H.

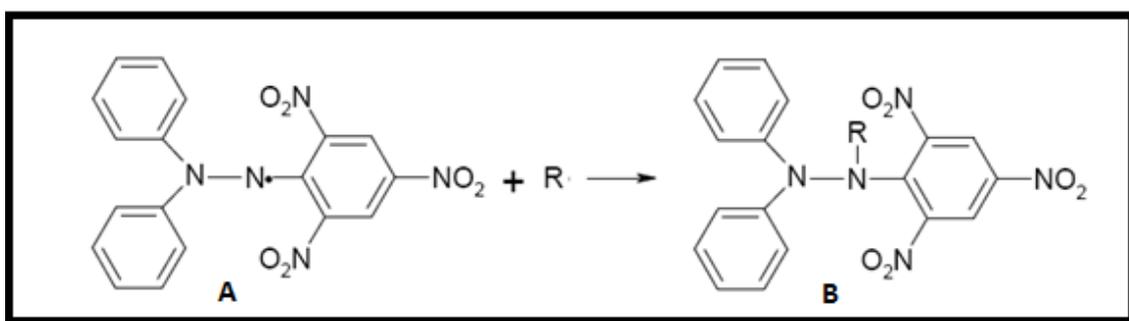


Figura 23 - Molécula de DPPH: A – na forma de radical livre estável; B – na forma de não radical (adaptado de Abdalla *et al.*, 1999).

Para a validação do método do radical DPPH foram testados os níveis de inibição da descoloração do DPPH dos padrões utilizados nomeadamente pelo antioxidante sintético BHT, e pelos antioxidantes naturais quercetina e ácido ascórbico, aplicados como controlo positivo para comparação com as amostras esses resultados encontram-se no Anexo I, Figura I, II e III.

Face aos padrões utilizados neste ensaio tanto a quercetina que é um composto fenólico que apresenta uma potente atividade antioxidante, uma vez que possui na sua estrutura química grupos que conferem as propriedades antioxidantes que estão representados na Figura 24; o mesmo se verificou relação ao BHT é um composto orgânico lipossolúvel e antioxidante usado na indústria alimentar com o código E321, que apresenta as suas propriedades conservantes. Assim, tal como em relação ao ácido ascórbico, por este método, os BPs não apresentaram bons valores para actividade antioxidante comparativamente aos valores dos padrões utilizados.

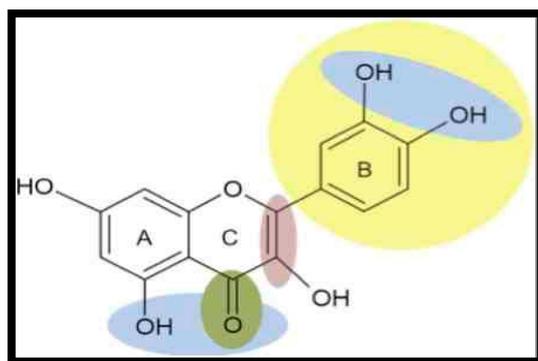


Figura 24- Estrutura química da quercetina, com indicação dos grupos que conferem a propriedade antioxidante (adaptado de Williams, 2004).

Os valores de percentagem de inibição de oxidação do padrão quercetina, existindo linearidade entre as concentrações de 2,5 a 50 $\mu\text{g/mL}$ quercetina, apresentando um valor de r^2 de 0,9974, tendo-se obtido um valor de IC_{50} de 32,2 $\mu\text{g/mL}$ (Anexo I, Figura I).

A Figura 25 ilustra a reação química entre o BHT e o radical DPPH^\bullet , onde o BHT vai ceder um electrão (H^\bullet), ao radical DPPH.

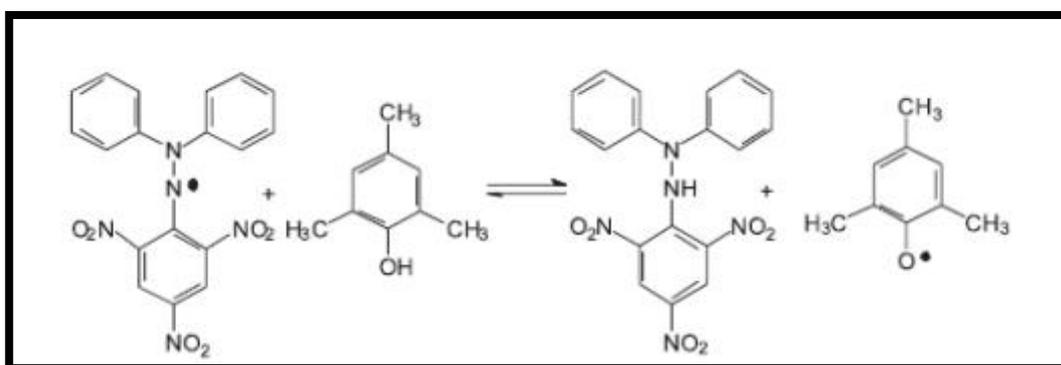


Figura 25- Reação química entre o BHT e o radical DPPH^\bullet (adaptado de Hocman, 1988).

Os valores correspondentes à percentagem de inibição de oxidação do BHT. Apresentaram linearidade entre as concentrações de 12,5 a 400 $\mu\text{g/mL}$. BHT, com um $r^2= 0,9828$, tendo-se obtido um valor de IC_{50} de 381,6 $\mu\text{g/mL}$ (Anexo I, Figura II).

Na reação de oxidação do ácido ascórbico inicialmente ocorre a perda de dois átomos de hidrogénio (H^\bullet) em dois grupos hidroxilo (OH), levando há a formação de um composto intermediário, o radical ascorbilo. No local onde houve esse perda dos átomos de hidrogénio, forma-se duas duplas ligações entre o oxigénio e o carbono presentes ($\text{C}=\text{O}$)

originando o produto final da oxidação, o ácido desidroascórbico como é demonstrado na Figura 26.

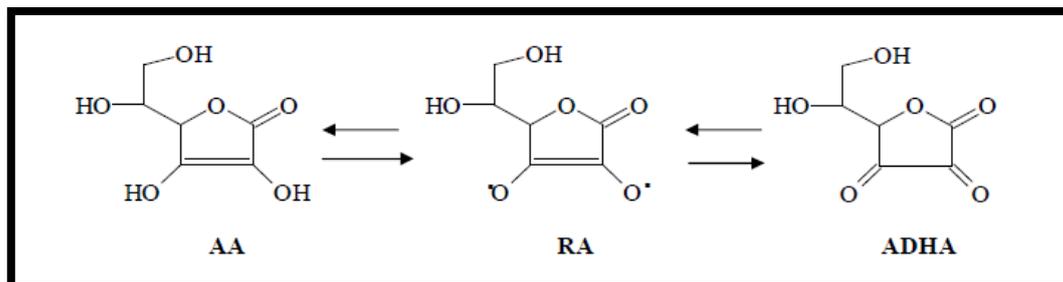


Figura 26- Esquema da reação de oxidação do ácido ascórbico a ácido desidroascórbico, com a formação do radical ascorbilo como composto intermediário (Buettner e Schafer, 1997).

Relativamente ao ácido ascórbico os valores de percentagem de inibição da oxidação, verifica-se que existe linearidade entre as concentrações de 1 a 50 µg/mL de ácido ascórbico. O valor obtido IC₅₀ correspondeu a 30,4 µg/mL (Anexo I, Figura III):

Neste ensaio foram utilizados diferentes padrões, com diferentes mecanismos de ação na atividade antioxidante, de modo a tentar compreender melhor o funcionamento dos BPs que são lipossolúveis como o BHT mas contrariamente ao ácido ascórbico que é hidrossolúvel. Na Tabela 6 são apresentados os valores de IC₅₀ obtidos para os diferentes padrões, pelo método do radical DPPH.

Tabela 6 - IC₅₀ dos padrões pelo método do radical DPPH.

IC ₅₀	[] µg/mL
Quercetina	32,2
BHT	381,6
Ácido ascórbico	30,4

Os compostos BPs estudados apresentam baixa capacidade na captação de radicais livres, com valores de inibição de oxidação de 2 a 7% para concentrações de 50 e 100 µg/mL não se tendo observado também linearidade na resposta de inibição de oxidação para concentrações superiores, parecendo haver algumas interferências na reação, possivelmente relacionadas com a solubilidade dos compostos.

Na Figura 27 são apresentados os valores de inibição de oxidação (%) dos BPs pelo método do radical DPPH. Assim, não foi possível calcular o valor de IC50 pelo método do radical DPPH, para os compostos sintetizados. O princípio do funcionamento deste método é a reação de redução do radical DPPH[•] pela captação de um átomo de hidrogénio de modo a formar outro radical, e originar a forma reduzida DPPH-H. Os resultados obtidos por este método sugerem que os BPs não atuam preferencialmente pela cedência de átomos de hidrogénio.

Os compostos sintetizados apresentam uma atividade antioxidante muito baixa por este método, a maior percentagem de atividade antioxidante foi apresentada pelos bisfosfonato BP2 e BP3, sendo que a inibição máxima foi cerca de 7% para as concentrações de 100 µg/mL para ambos.

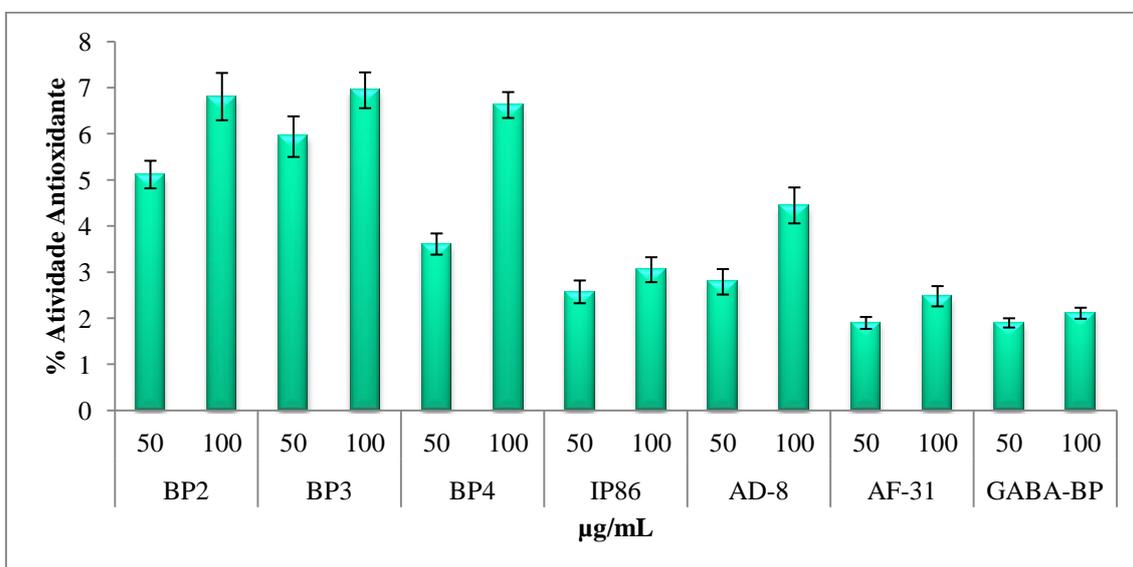


Figura 27 – Atividade antioxidante (% de inibição de oxidação) dos BPs pelo método DPPH. Os valores correspondem à média de 6 replicados.

Apesar dos compostos BPs apresentarem uma baixa capacidade na redução do radical DPPH, com exceção do AF-31, os restantes BPs em estudo apresentaram uma maior atividade antioxidante pelo método do DPPH do que o alendronato (GABA-BP), composto padrão.

Nas Figuras seguintes apresentam-se valores de atividade antioxidante expressas em ácido ascórbico e quercetina (Figura 28 e 29).

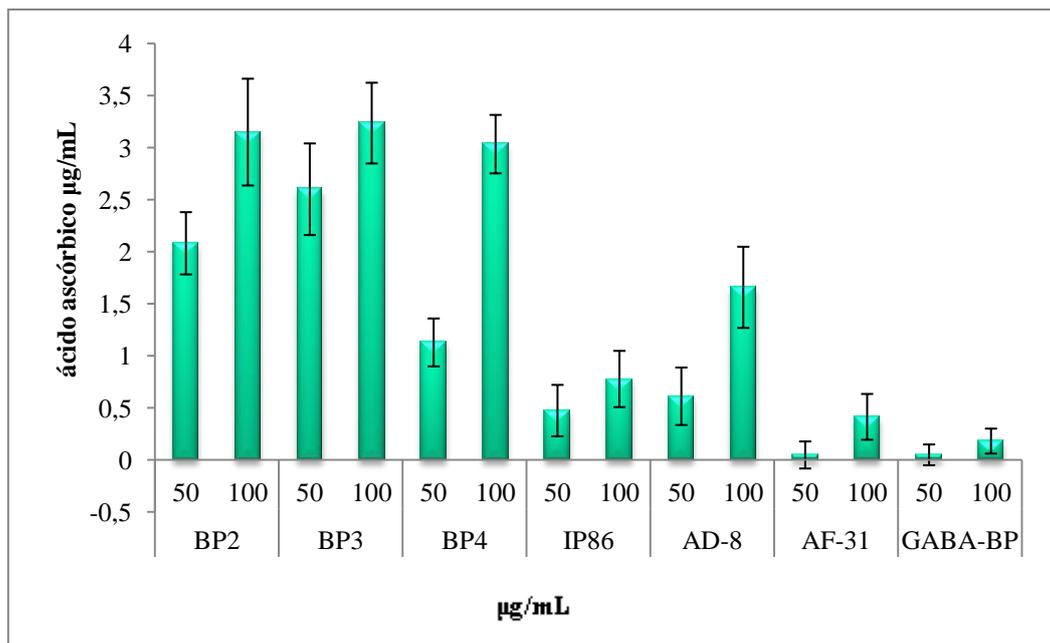


Figura 28 – Atividade antioxidante dos BPs pelo método DPPH, expressos em equivalentes de de ácido ascórbico (µg/mL).

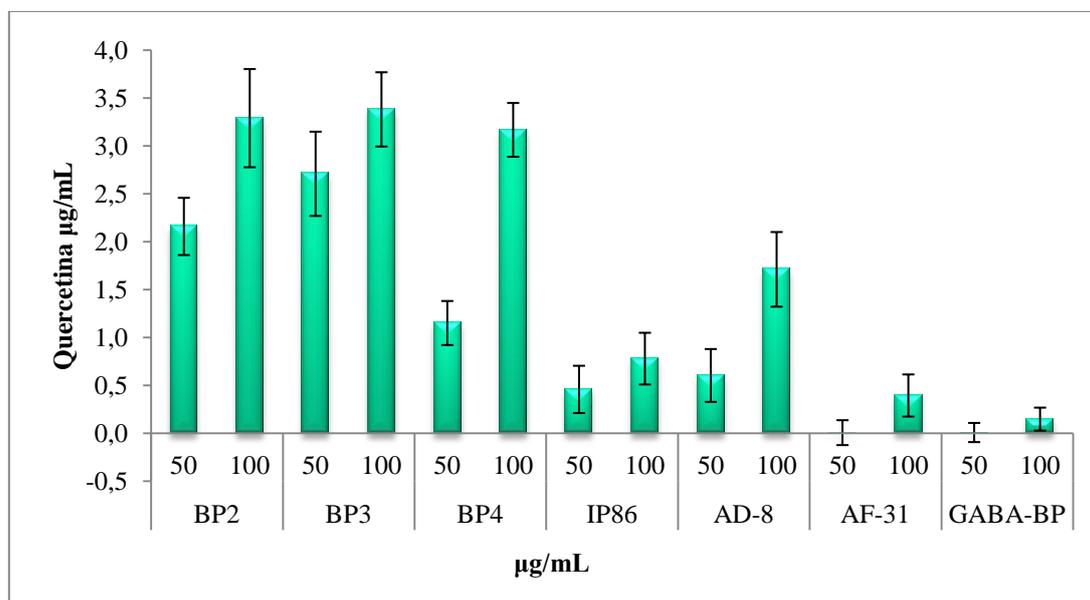


Figura 29 – Atividade antioxidante dos BPs pelo método DPPH, expressos em equivalentes de quercetina (µg/mL)

Pinelo *et al.* (2004) pelo método do radical DPPH mostraram no seu estudo que a adição de compostos fenólicos em sistemas complexos nem sempre promove um efeito positivo na capacidade antioxidante do sistema, pois foi observado um efeito de sinergismo negativo entre os três compostos fenólicos (catequina, resveratrol e

quercetina). Alguns estudos referem que os compostos antioxidantes presentes no extrato polar (antioxidantes hidrofílicos, entre eles os compostos fenólicos) são mais eficazes que os antioxidantes apolares, também referidos como lipofílicos (como os tocoferóis e carotenóides) na captação do radical. A captação média dos extratos apolares variou entre 18,6 e 32,2%, enquanto a captação média dos extratos polares variou entre 48,1 e 88,9%.

Pinilla *et al.* (2005) testaram a atividade antioxidante de uma mistura de tomate, pepino, pimentão verde, cebola e alho. Foram testadas as frações lipofílica e hidrofílica e as suas capacidades de captação do radical DPPH. Os seus resultados foram condizentes com os do estudo anterior de (Pinelo, *et al.* 2004), ou seja, a fração lipofílica da mistura (compostos apolares) apresentou atividade bastante inferior à hidrofílica (compostos polares) neste teste.

4.2.2 Método β -caroteno/Ácido linoleico

No sistema β -caroteno/ácido linoleico como padrões, à semelhança do procedimento utilizado no método do radical DPPH, utilizou-se o antioxidante sintético BHT, e os antioxidantes naturais quercetina e ácido ascórbico.

Os valores de percentagem de inibição da oxidação da quercetina, observa-se linearidade entre as concentrações de 6,5 a 40 $\mu\text{g/mL}$ de quercetina, apresentando um valor de r^2 de 0,9797. Para a quercetina foi obtido um valor de IC50 de 33,5 $\mu\text{g/mL}$ (Anexo I, Figura IV).

Relativamente os valores de percentagem de inibição da oxidação do ácido ascórbico, observa-se linearidade entre as concentrações de 1 a 8 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico, o valor de R^2 foi de 0,9833. Para o ácido ascórbico o valor IC50 foi de 7,9 $\mu\text{g/mL}$ (Anexo I, Figura VI).

Posteriormente os valores de percentagem de inibição da oxidação do BHT, verifica-se que existe linearidade entre as concentrações de 1 a 6 $\mu\text{g/mL}$ de BHT, apresentando um valor de R^2 de 0,9738 tendo-se obtido um valor de IC50 de 3,7 $\mu\text{g/mL}$ (Anexo I, Figura V).

Os compostos sintetizados neste estudo expressaram maior capacidade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico relativamente ao método DPPH. Tal facto

sugere que o modo de atuação destes compostos baseia-se na proteção da oxidação do substrato lipídico.

Na Figura 30 observa-se que os compostos que apresentaram uma maior percentagem da inibição da oxidação foram o BP2, IP86, BP4 e BP3, comparativamente ao bisfosfonato comercial utilizado neste estudo o GABA-BP foi o composto que apresentou pior atividade antioxidante face a todos os compostos estudados.

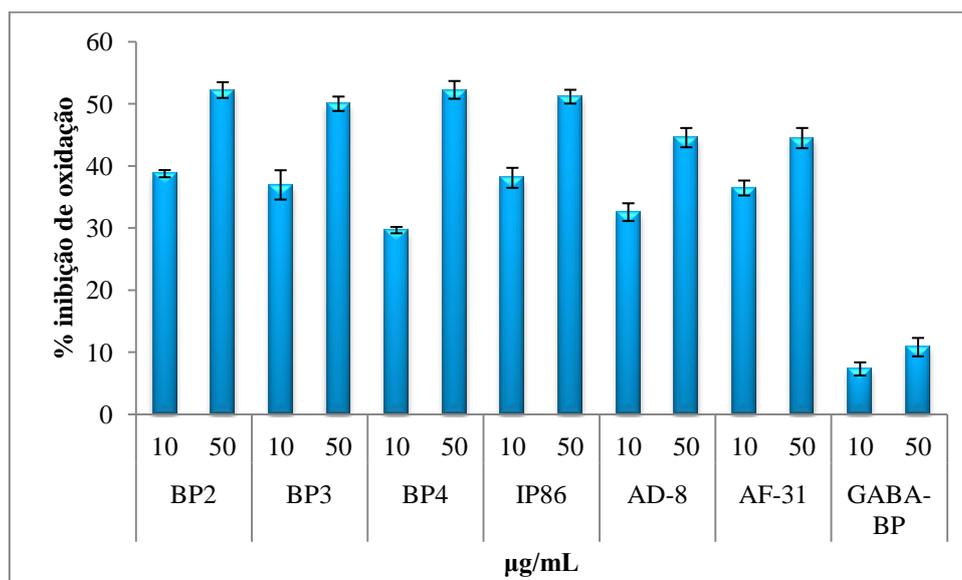


Figura 30- Atividade antioxidante (% de inibição de oxidação) dos BPs, pelo método β -caroteno/Ácido linoleico. Os valores correspondem à média de 6 replicados.

Os BPs em estudo apresentaram uma maior capacidade de inibição da oxidação pelo método β -caroteno/ácido linoleico relativamente ao método do radical DPPH. Assim, contrariamente ao método anterior foi possível calcular o IC50 de todos os compostos utilizados neste estudo à exceção do bisfosfonato comercial (GABA-BP).

Para o GABA-BP, devido ao facto de apresentar uma baixa atividade antioxidante, não foi possível calcular o seu IC50; deste modo extrapolou-se o seu valor como consta na Tabela 7.

Tabela 7 - IC50 dos compostos pelo método β -caroteno/Ácido linoleico.

IC50	[] $\mu\text{g/mL}$
Quercetina	33,5
BHT	3,7
Ácido ascórbico	7,9
BP2	34,2
BP3	50,1
BP4	40,23
AF-31	85,3
IP86	40,22
AD-8	124,1
GABA-BP*	370,5

* valor extrapolado

Na Figura 31, apresentam-se os valores de bisfosfonatos relativamente aos valores de quercetina, de expressos em $\mu\text{g/mL}$, apresentam-se valores de expressas em $\mu\text{g/mL}$ de quercetina de modo a melhor visualização dos resultados.

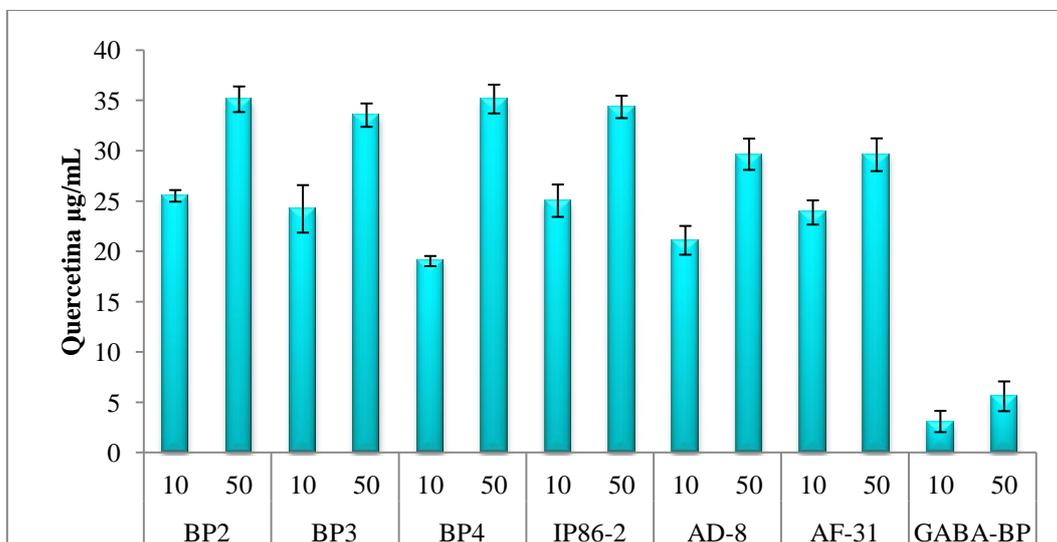


Figura 31- Atividade antioxidante dos BPs, pelo método β -caroteno/Ácido linoleico, expresso equivalentes de quercetina.

O facto dos compostos estudados apresentarem grande capacidade de inibição da oxidação pelo método β -caroteno/Ácido linoleico relativamente ao método DPPH, sugere que o modo de ação destes compostos baseia-se na proteção da oxidação do

substrato lipídico. O mecanismo de ação dos BPs parece não estar associado à capacidade de captação de radicais livres mas sim à proteção da oxidação do substrato lipídico.

O sistema β -caroteno/ácido linoléico é constituído por uma emulsão, sendo então considerado como um sistema aquoso-lipídico. Neste método a atividade antioxidante é avaliada pela capacidade do extrato ou antioxidante inibir o processo de oxidação do sistema, facto indicado pela descoloração do β -caroteno.

Já foi reportado na literatura que antioxidantes lipofílicos apresentam maior atividade antioxidante em emulsões (Moure et al., 2001). Alguns estudos referem que os valores de inibição da oxidação lipídica dos extratos apolares são superiores aos valores para o extrato polar, o contrário do que foi observado no método do DPPH.

Num estudo Goupy *et al.* (1999) isolaram compostos com atividade antioxidante de malte e cevada, e mostraram que os tocoferóis (α , β e δ -tocoferol) presentes no extrato de baixa polaridade são mais eficazes na inibição da oxidação lipídica que os compostos fenólicos. Enquanto os compostos fenólicos apresentaram entre 12 e 65% de inibição, os tocoferóis ficaram acima de 90%.

4.2.3 Avaliação do efeito protetor na hemólise do eritrócito

O eritrócito, exposto a diferentes condições de stress oxidante, foi utilizado para estudar o efeito antioxidante dos BPs. Neste trabalho *in vitro*, as condições foram obviamente diferentes e menos complexas do que as fisiológicas. Os outros componentes do sangue estão ausentes deste sistema, assim como a interação dos BPs com a albumina. Quanto ao sistema oxidante utilizado foi o cobre. Foi também determinada a formação de meta-hemoglobina, atendendo a que este metal é conhecido por provocar a oxidação da hemoglobina.

Neste ensaio o etanol foi utilizado como controlo negativo, uma vez que na presença dele existe um aumento da percentagem de hemólise e formação de meta-hemoglobina ao longo do tempo de incubação.

Para controlo positivo utilizou-se como antioxidante comercial a quercetina, tendo esta apresentado um efeito protetor no eritrócito a partir dos 180 minutos de incubação.

Na Figura 32 observou-se que o Cu (II) induziu eficazmente a hemólise, que começa a aumentar mais a partir dos 90 minutos, continuando até ao final da experiência (ensaio Cu (II) + etanol).

Nos ensaios com a quercetina, a inibição da hemólise observa-se a partir dos 180 minutos.

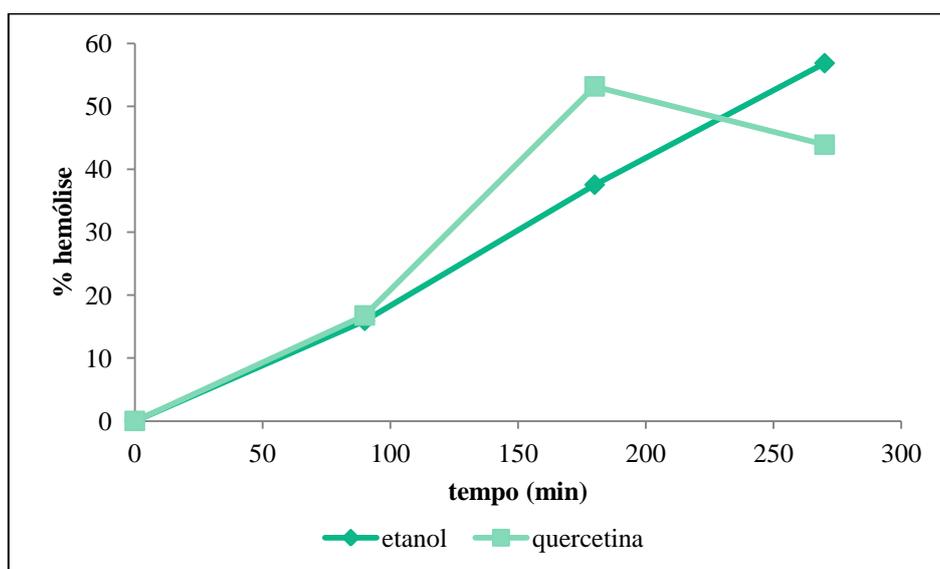


Figura 32 – Avaliação do efeito protetor do eritrócito, curva dos padrões, traduzida na % de meta-hemólise.

Os resultados da Figura 33 indicam que o Cu (II) induz a formação de meta-hemoglobina no eritrócito humano ao longo das experiências, com maior intensidade entre os 90 e 180 minutos (ensaio Cu (II) + etanol). Aos 90 minutos, ocorre um aumento da formação de meta-hemoglobina no padrão quercetina. Aos 180 minutos, a quercetina começa a inibir a formação de meta-hemoglobina enquanto o etanol continua a aumentar a formação da mesma até ao final do tempo de incubação (Figura 33).

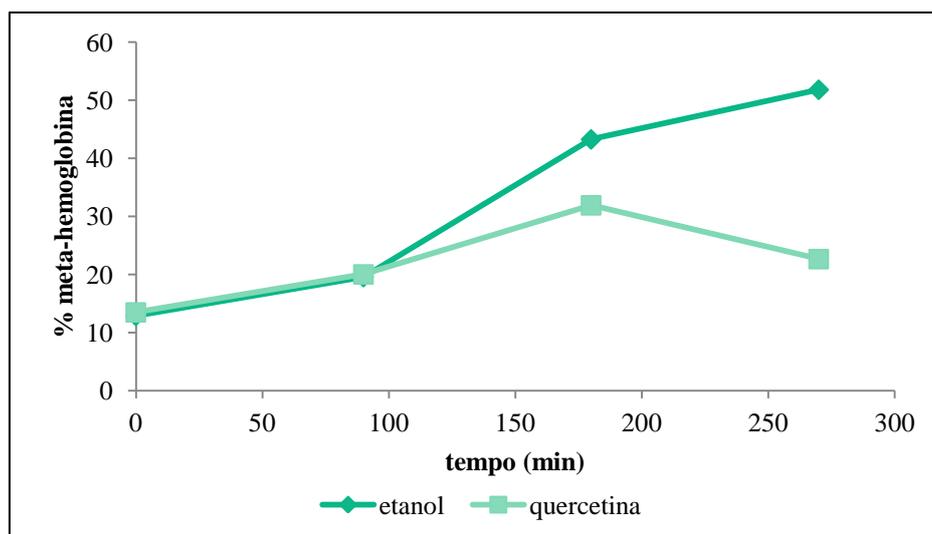


Figura 33 – Avaliação do efeito protetor do eritrócito, curva dos padrões, traduzida na % de meta-hemoglobina.

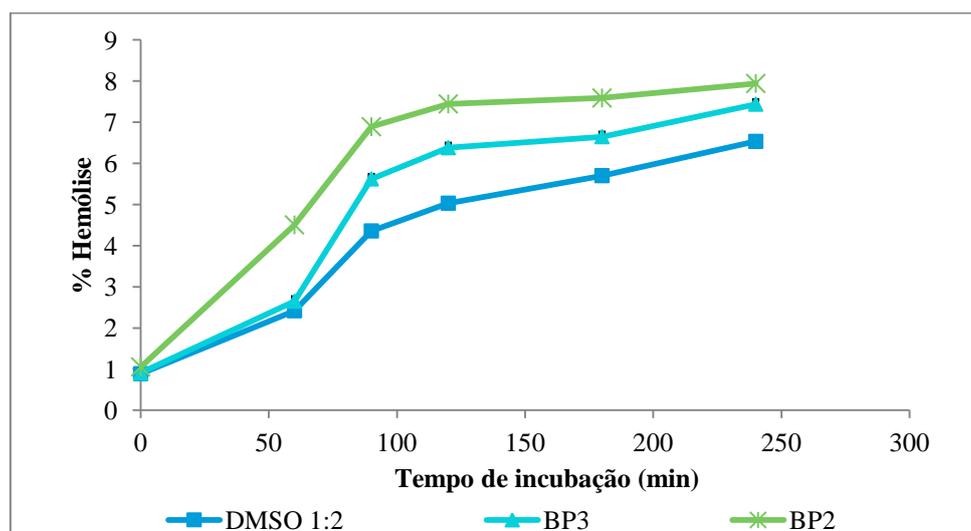


Figura 34 – Avaliação do efeito protetor do eritrócito dos BPs, e DMSO (controle positivo dos BPs), traduzida na % de hemólise.

Neste ensaio estudaram-se os compostos que nos ensaios de atividade antioxidante apresentaram melhores resultados nomeadamente o BP2 e BP3 e, como controlo, o DMSO na diluição de 1:2, uma vez que serviu como solvente dos compostos. Em ambos os compostos estudados relativamente à percentagem de hemólise não ocorre inibição ao longo do tempo de incubação (Figura 34).

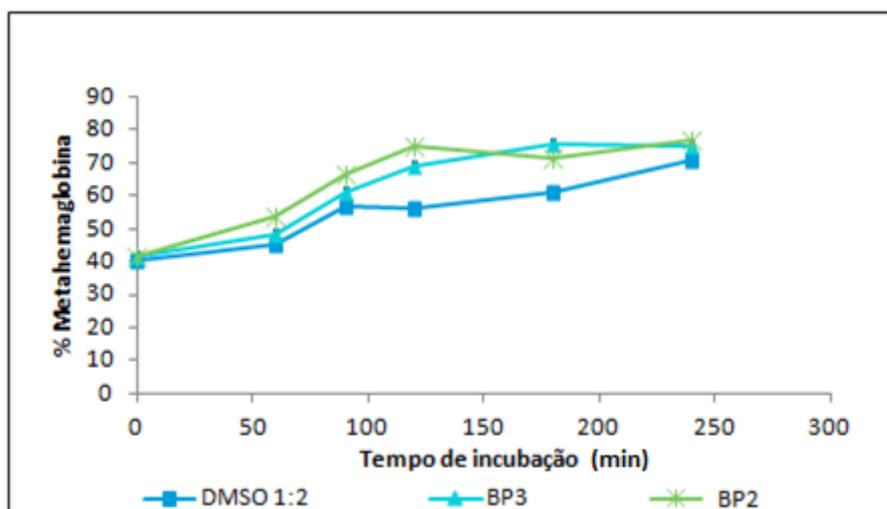


Figura 35- Avaliação do efeito protetor do eritrócito dos BPs, e DMSO (controlo positivo dos BPs), traduzida na % de meta-hemoglobina.

Contudo pela observação da Figura 35, relativo a percentagem de meta-hemoglobina formada verifica-se que o composto BP3 a partir dos 180 minutos inibe a percentagem de formação de meta-hemoglobina, apresentando um melhor efeito na proteção do eritrócito face ao BP2.

Num estudo Silva *et al.*, 2006, verificaram o efeito de flavonóides incorporados no eritrócito na lipoperoxidação, hemólise e formação de metahemoglobina induzidas por cobre. E obtiveram como resultados que a quercetina e rutina inibiram a lipoperoxidação estando por isso, provavelmente, incorporadas no eritrócito. Enquanto a quercetina apresentou um efeito protector da hemólise, a rutina não inibiu a hemólise. Este facto pode sugerir que os flavonóides apresentam uma localização intra celular diferente e protegem diferentes estruturas celulares importantes no processo hemolítico. Dos BPs estudados em ambas as determinações da percentagem de hemólise e meta-hemolobina, o BP3 foi o que apresentou melhores valores de proteção do stress oxidativo do eritrótico, contudo não apresentam resultados antioxidante tão evidentes como os flavonóides.

4.3 Avaliação da toxicidade em *Artemia salina*

O estudo da mortalidade de *Artemia salina* sujeitas a diferentes concentrações de compostos puros ou extratos, após 24 h do início da exposição, permite determinar a concentração letal (CL50) e conseqüentemente a toxicidade do composto (Sam, 1993).

Durante os ensaios com *Artemia salina* foi utilizado como controlo o dicromato de potássio em diversas concentrações. Este controlo é fundamental, pois mostra a sensibilidade do micro-crustáceo relativamente a uma solução tóxica. Foi determinado uma capresenta a curva dose-resposta de *Artemia salina* conforme o aumento da concentração de $K_2Cr_2O_7$ (Anexo II, Figura I).

Neste ensaio foram testados os BPs que apresentaram melhores resultados na avaliação da atividade antioxidante. Foram testadas diferentes concentrações dos compostos em estudo nomeadamente 300, 200, 150, 100, 75, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$. Como se pode verificar pelas curvas dose-resposta, o composto BP2 é o que apresenta uma maior percentagem de mortalidade de artémias em quase todas as concentrações estudadas. Na concentração mais elevada 300 $\mu\text{g/mL}$, os compostos BP2 (72%) e IP86 (69%) foram o que apresentaram uma maior toxicidade relativamente ao BP3 (52%) e GABA-BP (21%). O bisfosfonato comercial neste ensaio foi o que apresentou uma menor toxicidade nas diferentes concentrações testadas.

O composto GABA-BP apresentou baixa toxicidade para *Artemia salina*, tendo-se obtido uma mortalidade de 21% para a dose máxima testada (3000 mg/L).

Tabela 8- Valores de concentração letal 50% (CL50) obtidos pelos os compostos BP2, BP3, BP4 e IP86 face a *Artemia salina*.

Composto	CL50 mg/L	P_{value}
BP2	165,65	0,12
BP3	291,94	0,15
BP4	292,53	0,21
IP86	194,40	0,19
K₂Cr₂O₇	51,51	0,54

Observamos pela Tabela 8 que os compostos BP2, BP3, BP4 e IP86 apresentaram toxicidade elevada para *Artemia salina*, com valores de CL50 inferiores a 500 mg/L (Bastos *et al.*, 2009), no entanto apresentaram valores de CL50 superiores ao composto utilizado como padrão, o dicromato de potássio.

Alguns investigadores correlacionam os valores toxicidade obtidos para *Artemia salina*, com as atividades antioxidante, anti-carcinogénica e anti-mutagénica dos compostos bioactivos (Déciga-Campo, 2007)

Diversos estudos relacionam a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades antifúngica, antiviral, antimicrobiana, entre outras (Solis *et al.*, 1993; Siqueira *et al.*, 1998 e 2001; Moreira *et al.*, 2003).

Parra *et al.* (2001), utilizaram o teste com *Artemia salina* como um teste preliminar para avaliar a toxicidade do composto *Calophyllum brasiliense*, que demonstrou não possuir ação citotóxica sobre as células, o que é indispensável no caso de um tratamento seguro (Parra *et al.*, 2001).

4.4 Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos BPs foi determinada face a um grupo de isolados clínicos bacterianos, Gram negativos e Gram positivos, e leveduras patogénicas. Os ensaios por efetuados em difusão em meio sólido

4.4.1 Ensaio de difusão em meio sólido

A atividade antibacteriana dos bisfosfonatos foi determinada face a *E. coli*, *S. enteritidis*, *K. pneumoniae*, *M. morgani*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*, por difusão em meio sólido. Neste ensaio, o DMSO foi o controlo negativo uma vez que é o solvente utilizado para a dissolução dos compostos, não havendo inibição do crescimento dos microrganismos testados.

Os resultados do estudo da atividade antibacteriana pelo método de difusão em meio sólido estão sumarizados na Tabela 9 e os resultados dos microrganismos em estudo com os antibióticos padrão estão na Tabela 10.

Tabela 9 – Atividade antibacteriana dos bifosfonatos.

Microrganismos	BP2	BP3	BP4	GABA-	AD-8	AF-31	IP86
BP							
Diâmetro da zona de inibição em mm (24h)							
<i>E. coli</i>	8,0±0,6	12,8±1,4	7,7±0,6	6,0±0,0	6,3±0,6	13,0 ± 1,4	6,7± 0,6
<i>S. enteritidis</i>	10,0±0,8	11,7±0,6	8,0 ±0,0	6,0±0,0	6,8±0,6	7,3 ± 1,2	12,7±0,6
<i>K. pneumoniae</i>	7,7±0,6	14,0±0,5	ND	6,0±0,0	ND	ND	ND
<i>M. morgani</i>	8,0±1,0	10,7±0,4	14,3±3,5	6,0±0,0	7,0±0,0	10,7±3,5	9,33 ± 0,6
<i>P. mirabilis</i>	15,0±0,4	14,7±0,6	7,3 ± 0,6	6,0±0,0	7,7±0,6	10,3±1,5	10,0±0,0
<i>P. aeruginosa</i>	7,3±0,6	7,3±0,6	6,3±0,6	6,0±0,0	7,0±0,0	6,0 ±0,0	6,0±0,0
<i>S. aureus</i>	6,0±0,0	6,0±0,0	6,0±0,0	6,0±0,0	6,0±0,0	6,0 ±0,0	6,0±0,0
<i>E. faecalis</i>	6,0±0,0	6,0±0,0	7,0 ±0,0	6,0±0,0	6,0±0,0	6,7 ±0,6	7,0±1,0

Tabela 10- Registo da atividade antibacteriana dos antibióticos padrão.

Microrganismos	Ø halo inibição (mm)									
	AMC	TE	CF	GM	W	CRO	P	AMP	MH	AK
<i>E. coli</i>	22	6	6	14	6	23	ND	ND	ND	ND
<i>M. morgani</i>	ND	6	6	12	ND	9	ND	ND	8	17
<i>P.aeruginosa</i>	6	15	ND	15	6	6	ND	6	ND	ND
<i>P. mirabilis</i>	30	8	13	12	16	28	ND	ND	ND	ND
<i>S. enteritidis</i>	26	28	7	12	ND	25	ND	ND	ND	ND
<i>E. faecalis</i>	29	16	ND	18	6	6	22	ND	ND	ND
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	ND	ND	25	14	20	10	10	21	16	ND

AMC- Amoxicilina+Ácido Clavulâmico (30µg); AMP- Ampicilina (10µg); AK- Amicacina (30µg); GM- Gentamicina (10µg); MH- Minociclina (30µg); P- Penicilina G (10U); W- Trimetoprim (5µg); TE- Tetraciclina (30µg); CF – Cefalotina (30µg); CRO- Ceftriaxona (5µg); ND- Não determinado

.Os bifosfonatos apresentaram actividade antimicrobiana, nomeadamente para as bactérias Gram-negativas da classe Enterobactereaceae (Tabela 9).

À exceção do GABA e do AD8, todos os compostos BPs apresentaram actividade face à *E. coli*, com diâmetros da zona de inibição do crescimento compreendidos entre 7 e 13 mm.

O BP3 e o AF-31 (12,8 e 13,0 mm respetivamente) foram os que apresentaram, maior actividade face à *E.coli*, sendo esses valores semelhantes à da inibição com Gentamicina (14 mm). É ainda de referir que a actividade dos BPs para inibir o crescimento da *E. coli* foi superior à observada para alguns antibióticos de síntese, nomeadamente, a Tetraciclina, a Cefalotina e o Trimetoprim.

Os BPs apresentaram actividade antibacteriana para *S. enteritidis*, com diâmetros da zona de inibição compreendidos entre 6,83 e 12,67 mm, designadamente o BP3 e o IP86 (11,7 e 12,67 mm), que apresentaram actividade semelhante à Gentamicina (12 mm), e muito superior à Cefalotina (7 mm).

Relativamente a *K. pneumoniae* o BP3 foi o que apresentou um melhor resultado como antibacteriano com uma inibição do crescimento de 14,0 mm. Contudo para este microrganismo não foram testados todos os BPs.

O BP3 e o BP4, face a *M. morgani*, foram os BPs que fizeram uma maior inibição do crescimento de *M. morgani*, com halos de inibição de crescimento de 10,7 e 14,33 mm

respetivamente, tendo uma atividade antibacteriana semelhante a Gentamicina (12 mm) ainda que o BP4 apresente um valor superior. Estes BPs apresentaram uma inibição do crescimento superior face aos seguintes antibacterianos testados Minociclina, Tetraciclina, Cefalotina e Ceftriaxona.

Os BPs que apresentaram uma maior inibição do crescimento de *P. mirabilis* foram o BP2 com halo de inibição de 15,0 mm, e o BP3 com um halo de inibição de 14,7 mm. Esta atividade antibacteriana é semelhante à atividade de Cefalotina (13 mm) e do Trimetoprim (16 mm).

Os BPs com maior atividade face a *P. aeruginosa* foram o BP2 e o BP3, ambos com um halo de inibição de 7,3 mm, possuindo estes BPs uma atividade antibacteriana superior à Amoxicilina + Ácido Clavulâmico, Ampicilina, Trimetoprim, Ceftriaxona, possuindo todos eles um halo de inibição de 6 mm.

Para o *S. aureus*, os BPs em estudos não apresentaram atividade antibacteriana, isto é apresentaram todos um halo de inibição de 6,0 mm que corresponde ao diâmetro do disco, logo considera-se que não houve inibição do crescimento de *S. aureus*.

Por último para *E. faecalis* a maior parte dos BPs não provocou inibição do crescimento, apenas se verificou resultados positivos para BP4 (7,0 mm), AF-31 (6,67 mm) e IP86 (7,0 mm). Esta atividade antibacteriana é aproximada à da Trimetoprim e Ceftriaxona ambos com halos de inibição de 6,0 mm.

É de referir que relativamente ao GABA-BP (alendronato) foi testado também e contrariamente ao observado para os compostos sintetizados, este não apresentou qualquer atividade antimicrobiana.

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que o BP3 apresentou atividade antimicrobiana da mesma ordem de grandeza que alguns antibióticos de síntese.

Neste estudo não foi possível comparar os resultados obtidos com outros estudos, por não se encontrarem estudos de atividade antimicrobiana descritos para os bifosfonatos. No entanto, há a que referir que a dose de bifosfonato em estudo (50 µL) que apresentou atividade antibacteriana face às bactérias Gram negativas, é correspondente à ordem de grandeza que a dose aplicada em muitos dos compostos com atividade antimicrobiana, pelo que os compostos em estudo poderão também ter aplicação no tratamento de infeções causadas por Gram negativas, nomeadamente para as enterobactérias.

Os bifosfonatos em estudo mostraram atividade antibacteriana face às estirpes Gram-, *M. morgani*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, não se mostrando ativos para as estirpes de cocos Gram-.

Contudo os compostos BP2 e BP3 mostraram uma melhor atividade antimicrobiana face aos restantes compostos.

Os BPs encontram-se mais ativos para bactérias Gram-negativas. Estudos referem que existe resistência intrínseca das bactérias Gram-negativas aos agentes antimicrobianos, a qual tem sido associada à presença de uma membrana externa existente nesses microrganismos. Com isso o agente antimicrobiano encontra grande dificuldade de penetrar na célula, ou quando consegue a concentração não é alta o suficiente para apresentar o resultado esperado (Schaechter *et al.*, 2002).

Os compostos hidrofóbicos apresentam dificuldade de atravessar a membrana celular externa, devido a porção polar estar situada na face externa da membrana e por outro lado, compostos hidrofílicos apresentam a mesma dificuldade para atravessar a membrana devido ao interior hidrofóbico da membrana (Schaechter *et al.*, 2002).

Contudo contrariamente ao esperado, os BPs apresentam melhor atividade para Gram-negativas face as Gram-positivas.

A actividade antifúngica foi determinada face a *C. albicans*, *G. klebahnii*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Foram testados os compostos que apresentam melhor atividade antibacteriana nomeadamente o BP3 e o BP2. O DMSO à semelhança do ensaio da atividade antibacteriana também foi testado uma vez que foi o solvente utilizado na dissolução dos compostos. Os resultados encontram-se sumariados na Tabela 11.

Tabela 11- Atividade antifúngica dos bifosfonatos.

Microrganismos	BP ₃ (5µl)	BP ₂ (5µl)	GABA-BP (5µl)	DMSO (5µl)	Nistatina	
	Diâmetro da zona de inibição em mm (24h)					
Leveduras	<i>C. albicans</i>	si	si	si	si	14 ± 2
	<i>G. klebahnii</i>	6±0,5	si	si	si	19 ± 2
	<i>C. parapsilosis</i>	6±0,5	6±0,5	si	si	13 ± 1
	<i>C. krusei</i>	6±0,5	si	si	6±0,5	8 ± 2

si-sem inibição

No entanto pela observação da Tabela 11 verificamos que nenhum dos compostos em estudo mostrou atividade anti-fúngica face às leveduras patogénicas testadas.

4.4.2 Determinação da concentração mínima inibitória

A atividade antimicrobiana foi avaliada em meio líquido para determinação do valor de CMI.

Num primeiro estudo avaliou-se a actividade antimicrobiana para o BP3 uma vez que de entre os compostos em estudo, pela análise dos diâmetros dos halos de inibição, revelou ser o composto mais ativo face aos microrganismos Gram-, então a determinação da concentração mínima inibitória foram efetuados para este BP.

Os estudos de determinação da concentração mínima inibitória foram efetuados apenas para as enterobactérias, microrganismos para os quais o BP3 mostrou maior atividade antibacteriana. Os resultados encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12- Valores de CMI ($\mu\text{g/mL}$) obtidos para os BPs e para um antibacteriano de síntese (cloridrato de tetraciclina).

Isolados clínicos	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			
	BP3	BP4	AF31	Cloridrato de tetraciclina
<i>E. coli</i>	500	125	500	>40
<i>M. morgani</i>	500	62,5	62,5	>40
<i>P. aeruginosa</i>	1000	500	500	10
<i>P. mirabilis</i>	500	250	250	40
<i>S. enteritidis</i>	1000	250	500	0,25
<i>E. faecalis</i>	ND	ND	ND	5
<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	0,05

Pela Tabela 12 podemos observar que os compostos BP3, BP4 e AF31 apresentaram atividade antimicrobiana face a bactérias Gram -, com valores de CMI que variaram de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ a 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Existe um consenso geral de que são necessários novos agentes antifúngicos mais potentes, mas, sobretudo mais seguros. Para uso humano, existem limitadas opções terapêuticas.

Em primeiro lugar devemos lembrar de que a célula fúngica é uma célula eucariótica, então o composto pode ser tóxico tanto para o microrganismo patogénico quanto para o paciente (Zacchino *et al.*, 2003).

Lopes, Kato e Yoshida (1998), observaram a atividade antifúngica de flavonóides isolados de plantas, que apresentaram ação 10 vezes mais potente que a nistatina. A atividade antimicrobiana de flavonóides é provavelmente devido à sua capacidade de se complexar com proteínas e com a parede celular do microrganismo. Quanto mais lipofílico for o flavonóide, mais facilmente pode ocorrer a atividade antifúngica. As plantas em resposta a infeções causadas por microrganismos, sintetizam flavonóides, que quando testados *in vitro* apresentam ação antimicrobiana (Somchit *et al.*, 2003).

5- CONCLUSÃO

Os BPs são moléculas sintéticas, em que o prefixo “bis” indica a presença de dois grupos fosfonato ligados a um átomo de carbono (Winter, 2008). Foi a substituição do átomo de oxigénio entre os dois átomos de fósforo do ácido pirofosfónico por um átomo de carbono que abriu a possibilidade para a ligação de cadeias laterais. A possibilidade de variarem as cadeias laterais R₁ e R₂ permitiu o desenvolvimento de uma grande variedade de análogos cujas diferenças são responsáveis por diferentes propriedades farmacológicas.

Neste estudo procedeu-se à síntese de três BPs, e avaliou-se a atividade biológica dos BPs sintetizados bem como de outros compostos BPs cedidos pela Doutora Fátima Teixeira. Estes compostos foram avaliados relativamente às suas atividade antioxidante, toxicidade e atividade biológica.

Os BPs apresentaram atividade antioxidante com capacidade na proteção do substrato lipídico, com valores de IC₅₀ entre 34,2 e 124,1 µg/mL pelo método do β-caroteno/ácido linoleico.

No entanto, a atividade antioxidante pelo método do radical do DPPH foi inferior a 10%, parecendo ter baixo efeito na proteção de captação de radicais livres.

O BP3 apresentou um efeito protetor da hemólise do eritrócito tendo apresentado maior capacidade para inibir a formação de meta-hemoglobina do que o BP2.

Os BPs apresentaram toxicidade elevada para *Artemia salina*, com valores de CL₅₀ inferiores a 500 mg/L, sendo o BP comercial o que apresentou menor toxicidade.

Os BPs apresentaram ação antimicrobiana face a bactérias Gram-, nomeadamente da classe das *Enterobacteriaceae*, no entanto, alguns dos BPs, designadamente BP4 e AF31 apresentaram também atividade a outros microrganismos Gram-, designadamente *P. aeruginosa*.

O composto IP86 mostrou-se ativo face à maioria das enterobactereacee. A *Morganella morgani* (enterobacteraceae) mostrou maior sensibilidade a alguns BPs, do que à maioria dos antibióticos padrão.

Todos estes resultados na avaliação das propriedade antioxidantes, biológicas e toxicologicas dos bisfosfonatos derivados do indazole, pode-se afirmar que os novos compostos sintetizados para além das suas eventuais propriedades farmacológicas interinsecas às doenças e ao metabolismo ósseo, possuem outras propriedades vantajosas que o GABA um bisfosfonato comercial, não apresentam nomeadamente na proteção do organismo contra os radicais livres e também na ação contra alguns micrororganismos patogénicos.

Este trabalho veio permitir uma primeira abordagem sobre as propriedades dos bisfosfonatos tanto a nível da atividade antioxidante como a nível da atividade antimicrobiana que atualmente não se encontram descritas na literatura.

Assim, os estudos prosseguem no sentido de sintetizar novos compostos do grupo dos BPs, avaliar as suas propriedades biológicas e identificar as estruturas químicas que lhes conferem essas propriedades.

Pelo facto de os BPs utilizados serem derivados do indazole, e por isso constituírem uma classe nova de BPs, deverão ser efetuados mais estudos a fim de fazer uma melhor caraterização da suas propriedades químicas, toxicidade e atividades farmacológicas, incluindo estudos a nível da atividade anti-tumoral, adesão à hidroxiapatite e atividade contra determinados agentes infecciosos.

Bibliografia

- ✦ Adami S, Mian M, Gatti P, Rossini M, Zamberlan N, Bertoldo F,. (1994). Effects of two oral doses of alendronate in the treatment of Paget's disease of bone,15:415-7.
- ✦ Altman, R. D, Johnston, C.C., Khairi, M. R., Wellman, H., Serafini, A.N., Sankey, R .R. Influence of disodium etidronate on clinical and laboratory manifestations of Paget's disease of bone (osteitis deformans). N Engl J Med 1973;289: 1379-84..
- ✦ Astorg, P., Gradelet, S., Bergés, R., Suschetet, M. (1997). Dietary lycopene decreases the initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in the rat. *Nutrition and cancer*, Filadelfia, v.29, n.1, p.60-68.
- ✦ Barbosa, M.I.J., Borsarelli, C.D., Mercadante, A.Z. (2005). Light stability of spraydried encapsulated bixin with different edible polysaccharides preparations. *Food research international*, v.38, p.989-994.
- ✦ Bartl, R., Frisch, B., Tresckow, E. V., Bartl, C. (2007). Bisphosphonates in Medical Practice. Springer Berlin Heidelberg, Nova Iorque.
- ✦ Bastos, M., Lima, M., Conserva, L., Andrade, V., Rocha, E., Lemos, R. (2009). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8, 1.
- ✦ Becker, K., Bilezikian, J., Bremner, W., Hung, W., Kahn, C., Loriaux, D., Nylén, E., Rebar, R., Robertson, G., Snider, R., Wartofsky, L. (2001). Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism. Lippincott Williams & Wilkins, U.S.A.
- ✦ Bentzen, C., Mong, L., Niesor, E. (1982). Patente US nº 4,309,364.
- ✦ Black, J. G. (2002). Microbiologia: fundamentos e perspectivas. 4 ed. Guanabara. Rio de Janeiro.
- ✦ Body, J. J. (1997). Clinical research update zoledronate. *Cancer*, New York, v. 80, n. 8 supl., p. 1699-1701.
- ✦ Bosies, E. (1998). Patente DE nº 3,623,397.
- ✦ Boyce, R.W., Paddock, C.L, Gleason, J.R., Sletsema, W.K., Eriksen, E.F. (1995). The effects of risedronate on canine cancellous bone remodeling: three-

dimensional kinetic reconstruction of the remodeling site. *J. Bone Minerv. Res.*, v. 10, p. 211-21.

- ✦ Brand, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, Londres, v. 28, n. 1, p. 25-30.
- ✦ Buettner, R., Schafer, Q. (1997). Ascorbate (vitamin C) its antioxidant chemistry. *Oxygen Society of Education Program*, p.1-20, 1997.
- ✦ Carter, G., Goss, A. N., Doecke, C. (2005). Bisphosphonates and avascular necrosis of the jaw: a possible association. *The Medical Journal of Australia, Sidney*, v. 182, n. 8, p. 413- 415.
- ✦ Castro, L. F., Silva, A.T.A., Chung, M.C. (2004). Bisfosfonatos (BFs) como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos. *Quim. Nova*, v.27, n.3, p.456-60, 2004.
- ✦ Cavalcante, M. F., Oliveira, M. C. C., Velandia, J. R., Echevarria, A. (2000) Síntese de 1,3,5-Triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, v. 23, p. 20-22.
- ✦ Cheng, Z., Ren, J., Yan, G., Li, Y., Chang, W., Chen, Z. (2003). Quantitative elucidation of the molecular mechanisms of hydroxyl radical quenching reactivity of phenolic compounds. *Bioorg. Chem.*, v.31, n.2, p.149-162.
- ✦ Coelho A., Gomes P., Fernandes M. 2010. Osteonecrose dos Maxilares Associada ao Uso de Bifosfonatos. Parte I: Etiologia e Apresentação Clínica. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac*, 51, 95-101.
- ✦ Daughton, C.G. (2003). Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. 1. Rationale for and avenues toward a green pharmacy. *Environ. HealthPerspect.* 11 , 757-774.
- ✦ Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Angeles-López, G., Navarrete, A., Mata, R. (2007). *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 334.
- ✦ Drake, M. T., Clarke, B. L., Khosla, S. 2008. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice. *Mayo Clin Proc.*, 83, 1032-1045.
- ✦ Elguero, J., Fruchier, A., Tijou, E.M., Trofimenko, S. (1995). *Khim. Geterotsikl. Soedin*, 9, 1159.
- ✦ Elguero, J., Katritzky, A.R., Rees, C.W. (1984). Pergamon Press, Oxford, 5, 167.

- Felix, R., Bettex, J., Fleisch, H. (1981). Effect of diphosphonates on the synthesis of prostaglandins in cultured calvaria cells. *Calc. Tissue Int.*, v.33, n.5, p.549-52,
- Fernandes, C., Leite, R. S., Lanças, F. M. (2005). Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. *Química Nova*, v. 28, n. 2, p. 274-280.
- Fernández, A. J. F., Martínez, J. B., Diago, M. P., Bagán, J.V. (2009). Bisphosphonates and dental implants: Current problems. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 14(7), 355-60.
- Fernandez, N. P., Fresco, R. E., Urizar, J. M. A. (2006). Bisphosphonates and oral pathology I. General and preventive aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 11(5), pp. 396-400.
- Ferreira, W.F.C., Sousa, J.C.F. (2000). Microbiologia, Lidel, Edições Técnicas, Volume 2.
- Fisher, F., Cook, N. B. (2001). Micologia fundamentos e diagnóstico. *Reviter*. Rio de Janeiro.
- Fitch, S. J., Moedritzer, K. (1962). N.m.r. Study of the P-C(OH)-P to P-C-O-P Rearrangement: Tetraethyl 1-Hydroxyalkylidenediphosphonates. *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 1876.
- Fleisch, H. (1989). Bisphosphonates: a new class of drugs in diseases of bone and calcium metabolism. *Cancer Res*, v.116, p.1-28.
- Fleisch, H. (1991). Bisphosphonates: Pharmacology and use in the treatment of tumourinduced hypercalcaemic and metastatic bone disease. *Drugs*, v.42, n.6, p.919-44.
- Fleish, H. (2002). Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res.*, 4(1), pp.30-4.
- Fleish, H. (2007). Bisphosphonates: Mechanisms of action. *Endocrine Reviews.*, 19(1), pp.80- 100.
- Gerlach, M., Shachar, D., Riederer, P., Youdim, M. (1994). Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J. Neurochemistry* 63, 793.
- Giger, W. (2002). Produits chimiques: Facteurs de risque pour environnement et la santé, *EA WAG news* 53, 3-5.
- Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P., Amiot, M.J. Antioxidant composition and activity

- ✦ Green, J R. (2000). Anti-tumor potential of biphosphonates. *MedKlin*, 95 2:23-8.
- ✦ Guénin, E., Degache, E., Liquier, J., Lecouvey, M. (2004). Synthesis of 1-Hydroxymethylene-1,1-bis(phosphonic acids) from Acid Anhydrides: Preparation of a New Cyclic 1-Acyloxymethylene-1,1-bis(phosphonic acid). *Eur. J. Org. Chem.*, 2983.
- ✦ Gutta, R., Louis, P.J. (2007). Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws: science and rationale. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v.104, n.2, p.186-193.
- ✦ Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59, 1609.
- ✦ Halliwell, B., Gutteridge, J. (1986). *Arch. Biochem. Biophys.* 246,501.
- ✦ Halliwell, B., Gutteridge, J. (1989). Free radical in Biology and Medicine. Lipid peroxidation: a radical chain reaction, *Claredon Press*, Oxford.
- ✦ Halliwell, B., Gutteridge, J. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Methods Enzymol.* 186, 1.
- ✦ Hardman, J., Gilman, A., Limbird, L. (1996). The pharmacological basis of Therapeutics, Goodman & Gilman's, McGraw-Hill.
- ✦ Hocman, G., (1988). Chemoprevention of cancer: Phenolic antioxidants (BHT, BHA). *Int. J. Biochem.*, 20: 639-651.
- ✦ Hughes, D.E., Wright, K.R., Uy, H.L, Sasaki, A., Yoneda, T., Roodman, G.D. (1995). Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J. Bone Miner. Res.*, v.10, n.10, p.1478-87.
- ✦ Jaeggi, K., Wildler L. (1990) Patente US. N° 4,939, 130.
- ✦ Jawetz, E., Melnick, J., Adelberg, L. (2000). *Microbiologia médica*, 21 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro.
- ✦ Kern, M. E., Blevins, K. S. (1999). *Micologia médica*, 2 ed. São Paulo: Premier.
- ✦ Kieczkowski, G., Jobson, R., Melillo, D., Reinhold, D., Grenda, V., Shinkai, I. (1995). Preparation of (4-amino-1-hydroxybutylidene) bisphosphonic acid sodium salt, MK-217 (alendronate sodium). An improved procedure for the preparation of 1-hydroxy-1, 1-bisphosphonic acids. *J. Org. Chem*, 60, 8310–8312.
- ✦ Kim, K. J. (2002). A novel bisphosphonate inhibits inflammatory bone resorption in rat osteolysis model with continuous infusion of polyethylene particles. *J. Orthop. Res.*, v.20, n.3, p.499-505.

- ✦ Korkina, L., Afanas, I. (1997). Antioxidants in disease. Mechanisms and therapy. *Advances in Pharmacology*, H. Sies (Ed.), Academic Press, Inc. San Diego.
- ✦ Kumar, V., Pass, B., Guttenberg, S., Ludlow, J., Emery, R., Donald, A. (2007). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: A report of three cases demonstrating variability in outcomes and morbidity. *J Am Dent Assoc.* 138, pp. 602-609.
- ✦ Lacaz, C. S., Porto, E., Martins, J. E. C., Heins-Vaccari, E. M., De Mello, N.T. (2002). *Tratado de micologia médica*. Sarvier. São Paulo.
- ✦ Lecouvey, M., Leroux, Y. (2000). *Heteroat. Chem.*, 11, 556.
- ✦ Lehenkari, P.P., Kellinsalmi, M., Napankangas, J.P., Ylitalo, K.V., Mönkkönen, J., Rogers, M.J. (2002). Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Molecular Pharmacol*, 61:1255–1262.
- ✦ Levinson, W., Jawetz, E. (2005). *Microbiologia médica e imunologia*. 7 ed. Artmed Porto Alegre.
- ✦ Lien, E., Ren, S., Bui, H., Wang, R. (1999). *Free Rad. Biol. Med.* 26, 285.
- ✦ Lin, J.H. (1996). Bisphosphonetes: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone*, v.18, n. 2, p. 75-85.
- ✦ Lopes, N.P., Kato, M.J., Yoshida, M. (1998). Antifungal constituents from roots of *Virola surinamensis*. *Phytochemistry*, v. 00, p. 1-5.
- ✦ Madhavi, D., Deshpande, S., Salunkhe, D. (1997). *Food Antioxidants. Technological, Toxicological and Health Perspectives*, mdi. USA.
- ✦ Mandel, S., Youdim, M. (2004). Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Rad. Biol. Med.* 37, 304.
- ✦ Mangels, A.R., Holden, J.M., Beecher, G.R., Forman, M.R., Lanza, E. (1993). Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. *Journal of the American Dietetic Association*, v.93, n.3, p.284-296.
- ✦ Mapari, S.A., Meyer, A.S., Thrane, U. (2009). Photostability of natural orange-red and yellow fungal pigments in liquid food model systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, v.57, n.14, p.6253-6261.
- ✦ McConnell, R. L., Coover H.W. (1956). Preparation of 1-Hydroxyalkylidenediphosphonates *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 4450.

- ✦ Middleton, E., Kandaswami, C. (1994). The flavonoids. Advances in research since 1986, J. Harborne (Ed.); *Chapman & Hall*, London.
- ✦ Moreira, F.P.M., Coutinho, V., Montanher, A.B.P., Caro, M.S.B., Brighente, I.M.C., Pizzolatti, M.G.(2003). Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* bioatividade sobre *Artemia salina*. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 309-311.
- ✦ Moreira, J. B., Sidrim, J.C. (1999). Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. *Guanabara Koogan*. Rio de Janeiro.
- ✦ Moreira, V., Vasaitis, T., Njar, V., Salvador, J. (2007). Synthesis and evaluation of novel 17-indazole androstene derivatives designed as CYP17 inhibitors. Science direct. *Steroids*. 72, 939-948.
- ✦ Moure, A. Cruz, J.M., Franco, S. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*, v. 72, p. 145-171,
- ✦ Murakami K, Mawatari S (2003). Oxidation of hemoglobin to methemoglobin in intact erythrocyte by a hydroperoxide induces formation of glutathionyl hemoglobin and binding of hemoglobin to membrane. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 417, 244–250.
- ✦ Murray, P., Kobayashi, G., Rosenthal, K., Pfaller, M. (2002). Microbiologia médica. 4. ed. *Guanabara Koogan*. Rio de Janeiro.
- ✦ NCCLS. (2003). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4].
- ✦ Ott, S.M. (1993). Clinical effects of bisphosphonates in *involutional* osteoporosis. *J. Bone Miner.*, res. 8, Suppl. 2: S597-606.
- ✦ Paiva, S.A, Russell, R.M. (1999). Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition* v.18, p.5, p.426-433.
- ✦ Parfitt, A.M. (1996). A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates (theoretical perspective). *J. Bone Miner. Res.*, v. 11, n. 2, p. 150-9.
- ✦ Parra, A.L., Yhebra, R.S., Sardiñas, G.I, Buella, L.I. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, v. 8, n. 5, 395-400.

- ✦ Peterson, J., Dwyer, J. (1998). Taxonomic classification helps identify flavonoid-containing foods on a semiquantitative food frequency questionnaire. *J Am Diet Assoc.* 18.
- ✦ Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., Núñez, M.J. (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chem*, 85: 267-273.
- ✦ Pinilla, M.J. *et al.* (2005). Hydrophilic and lipophilic antioxidant capacities of commercial Mediterranean vegetable soup (Gazpachos). *J Food Sci*, v. 70, n. 1, p. S60-S65.
- ✦ Plotkin, L.I, Weinstein, R.S, Parfitt, A.M, Roberson, P.K, Manolagas, S.C, Bellido, T.(1999). Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest*, 104:1363-74.
- ✦ Rahman, A. (2001). *Bioassay Techniques for Drug Development*. 1st Edition. Harwood Academic Publishers, Netherlands.
- ✦ Rao, A.V., Rao, L.G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological research*, v.55 (3), p.207-217.
- ✦ Reis, F., Wagner, R. (2007). Farmácos, ETEs e corpos hídricos. *Revista Ambiente e Água*, v. 2, n.3, p.55-61.
- ✦ Reszka, A. A. (2004) Mecanismos de acción e los bisfosfonatos. In: Moral, J. A. R., Macías, J. G. *Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral*. Madrid, p. 175-181.
- ✦ Ribeiro, P., Seravalli, G., (2004). *Química de Alimentos*. 1ª edição, Edgard Blücher Ltda, São Paulo, p. 155-157, 2004.
- ✦ Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 20, 933.
- ✦ Rodan, G. A. (1998). Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr. Rev.*, v.19, n.1, p.80-100.
- ✦ Rodan, G. A. (1998). Mechanisms of action of bisphosphonates. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.*, v.38, p.375-88.
- ✦ Rodan, G.A., Fleisch, H.A. (1996). Bisphosphonates: mechanisms of action (Perspectives). *J. Clin. Investigation*, v. 97, n. 12, p. 2692-96.
- ✦ Rogers, M. J., Gordon, S., Benford, H.L. (2000). Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer*, v. 88, n. 12 supl., p. 2961-2978.

- Roodman, G.D. (1999). Cell biology of the osteoclast. *Exp. Hematol.*, v. 27, n. 8, p. 1229-1241,
- Rosado, F., Germano, S., Carbonero, E.R., da Costa, S.M.G, Iacomini, C., Kemmelmeier, M. (2003). Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures *Pleurotus ostreatoroseus* sing and *Pleurotus ostreatus*. kummer. *J. Bas. Micro.* 43, 230-237.
- Ruel, R., Bouvier, J., Young R. (1995). Single-Step Preparation of 1-Hydroxybisphosphonates via Addition of Dialkyl Phosphite Potassium Anions to Acid Chlorides. *J. Org. Chem.*, 60, 5209.
- Russel, A.D., Chopra, I. (1990). Understanding antibacterial action and resistance. Ellis Horwood, Nova Iorque, p.246.
- Russel, R.G., Rogers, M.J. (1999). Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone*, v. 25, n. 1, p. 97-106.
- Sam, T.W. (1993). Toxicity Testing Using the Brine Shrimp: *Artemia salina*. In: Bioactive Natural Products Detection, Isolation, and Structural Determination, Colegate, S.M. and R.J. Molyneux (Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL., pp: 442-456.
- Scharechter, M., Engleberg, N. C., Eienstein, B. I., Medoff, G. (2002). Microbiologia: Mecanismos de Doenças Infeciosas. 3 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro
- Schmidt, A., Beutler, A., Snovydyovych, B. (2008). Recent Advances in the Chemistry of Indazoles. *Eur J. Org. Chem.*, 4073.
- Seeley R. R., Stephens T. D., Tate, P. (2007). Anatomia & Fisiologia. 6ª edição. McGraw-Hill Higher Education.
- Silva, J.N., Beirão, T., Filipe, P., Fernandes, A. (2006). Efeito de flavonóides no stresse oxidante e foto-oxidante no eritrócito humano. *Boletim da SPHM* Vol. 21.
- Simmelink, J.W. (1987). Ultrastructural effects of diphosphonates on dental enamel. *Adv. Dent. Res.*, v.1, n.2, p.356-65.
- Siqueira, J.M., Bomm, M.D., Pereira, N.F.G., Garcez, W.S., Boaventura, M.A.D. (1998). Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, v. 21, n. 5, p. 557-559.

- ✦ Siqueira, J.M., Ziminiani, M.G., Resende, U.M., Boaventura, M.A.D. (2001). Estudo Fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, v. 24, n. 2, p. 185-187.
- ✦ Siris, E.S., Canfield, R.E., Jacobs, T.P., Stoddart, K.E., Spector, P.J. (1981). Clinical and biochemical effects of EHDP in Paget's disease of bone: patterns of response to initial treatment and to long-term therapy. *Metab Bone Dis Relat Res*, 3:301-8.
- ✦ Smith, R., Russell, R.G., Bishop, M. (1971). Diphosphonates and Paget's disease of bone. *Lancet*, 1:945-7.
- ✦ Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P., Phillipson, D. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta Medica*, v. 29, p. 250- 252,.
- ✦ Somchit, M.N., Reezal, I., Nur, I.E., Mutalib, A.R. (2003). In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 84, p. 1-4.
- ✦ Storm, T., Thamsborg, G., Steiniche, T., Genant, H.K., Sørensen, O.H. (1993). Changes in bone histomorphometry after long-term treatment with intermittent, cyclic etidronate for postmenopausal osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.*, v. 8, p. 199-208.
- ✦ Suchara, E. A.(2007). Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de fármacos em fluidos biológicos e amostras ambientais por cromatografia líquida e gasosa. 109 f. *Dissertação (Doutorado)* - Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis.
- ✦ Takeuchi, M., Sakamoto, S., Kawamuki, K., Kurihara, H., Nakahara, H., Iamamura, Y. (1998). *Chem. Pharm. Bull.*, 46, 1703.
- ✦ Teixeira, F. C., Antunes, I. F., Curto, M. João M., Neves, M., Teixeira, A.P.S. (2009). Novel 1-hydroxy-1,1-bisphosphonates derived from indazole: synthesis and characterization, *ARKIVOC* (xi) 69-84.
- ✦ Teixeira, F.C., Antunes, I.F., Curto, M.J.M., Neves, M. (2006). *XX Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química*, P222.
- ✦ Teixeira, F.C., Teixeira, A.P.S, *manuscrito em preparação*.
- ✦ Teixeira, M.F.C. (1999). "Regio- and selective synthesis on chromium tricarbonyl complexes" Tese de Doutoramento (FCUL), Lisboa.

- ✦ Ternes, T. A., Stumpf, M., Muller, J., Haberer, K., Wilken, R. D., Servos, M. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The Science of the total Environment*, v. 225, n. 1/2, p. 81-90.
- ✦ Trabulsi, L. R., Alterthum, F., Gompertz, O. F., Candeias, J. A. N. (2005). *Microbiologia*. 4. ed. Atheneu. São Paulo.
- ✦ Van den Wyngaert, T., Huizing, M. T., Vermorcken, J. B. (2006). Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: cause and effect or a post hoc fallacy?. *Ann. Oncol.*, 17(8), pp. 1197-04.
- ✦ Vasconcelos, D. V., Duarte, M. E., Maia, R. C. (2004). Efeito anti-tumoral dos bisfosfonatos: uma nova perspectiva terapêutica. *Rev. Bras. Cancer.*, v. 50, n. 1, p. 45-54.
- ✦ Vogel, A. I. (1951). A textbook of practical organic chemistry including qualitative organic analysis. *Longmans*, Londres.
- ✦ Von Baeyer, H., Hoffman K.A. (1897). *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 30, 1973.
- ✦ Wada, H.; Fernando, Q.; (1971) Determination of formation constants of copper (II) complexes of (hydroxyethylidene)diphosphonic acid with solid state cupric ion-selective electrode *Anal. Chem*, 43, 751.
- ✦ Williams, J. (2004). Antioxidants or signalling molecules? *Free Rad Biol. Med.* v. 36, n. 7, p. 838-849.
- ✦ Woo, S. B., Hellstein, J. W., Kalmar, J. R. (2006). Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med.*, 144(10), pp. 753-61.
- ✦ Yuting, C., Rongliang, Z., Zhongjian, J., Yong, J. (1990). Antioxidant Food Supplements in Human Health. *Free Rad. Biol. Med.* 9, 19.
- ✦ Zacchino, S.A., Yunes, R.A., Cechinel Filho, V., Enriz, R.D., Kouznetsov, V., Ribas, J.C. (2003). The need for new antifungal drugs: screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In: RAI, M.; MARES, D. (Editors) *Plant-derived antimycotics: current trends and future prospects*. TheHaworth Press, p. 1-41.

Anexos

Anexo I- Avaliação da atividade antioxidante

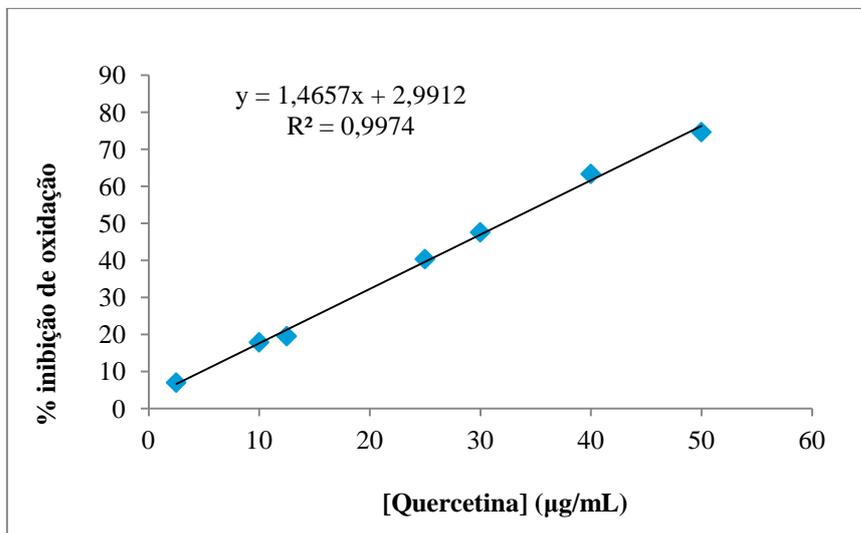


Figura I – Atividade antioxidante (% de inibição de oxidação) do padrão quercetina, pelo método DPPH. Os valores correspondem à média de 6 replicados.

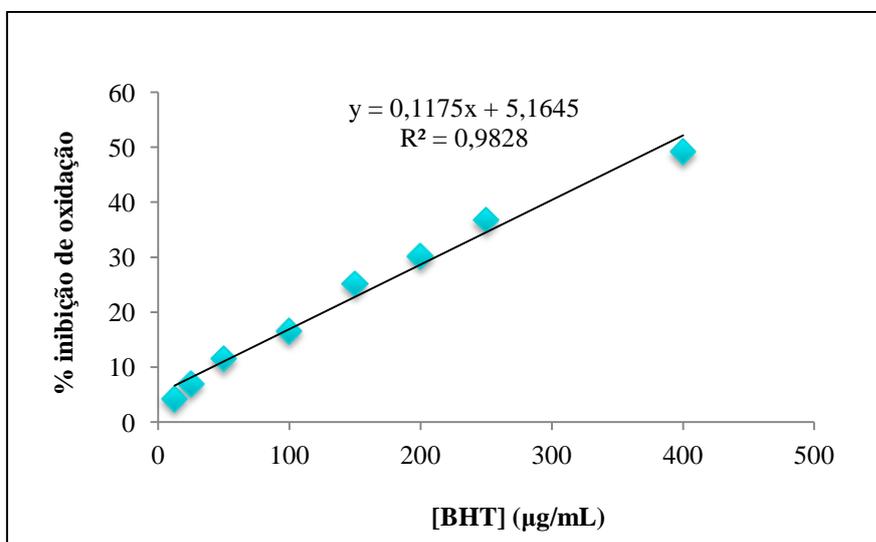


Figura II – Atividade antioxidante (% de inibição de oxidação) do padrão BHT, pelo método DPPH. Os valores correspondem à média de 6 replicados.

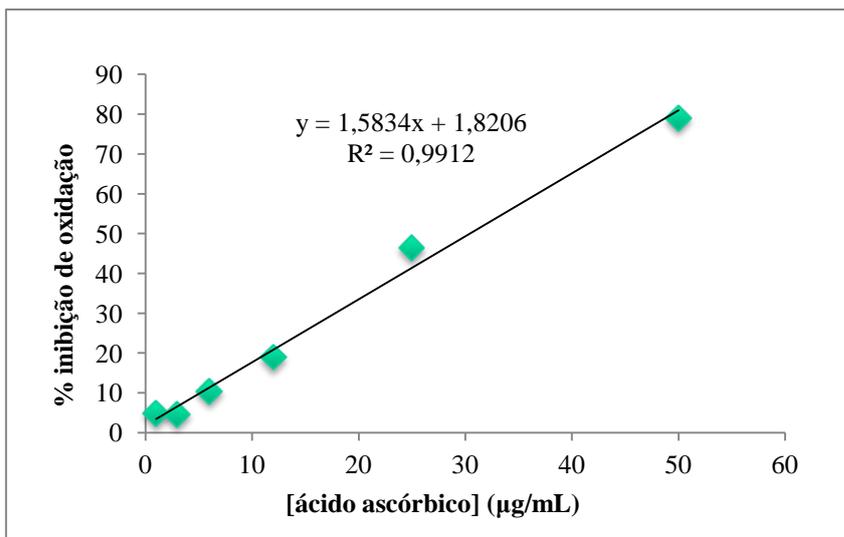


Figura III – Atividade antioxidante (% de inibição de oxidação) do padrão ácido ascórbico, pelo método DPPH. Os valores correspondem à média de 6 replicados.

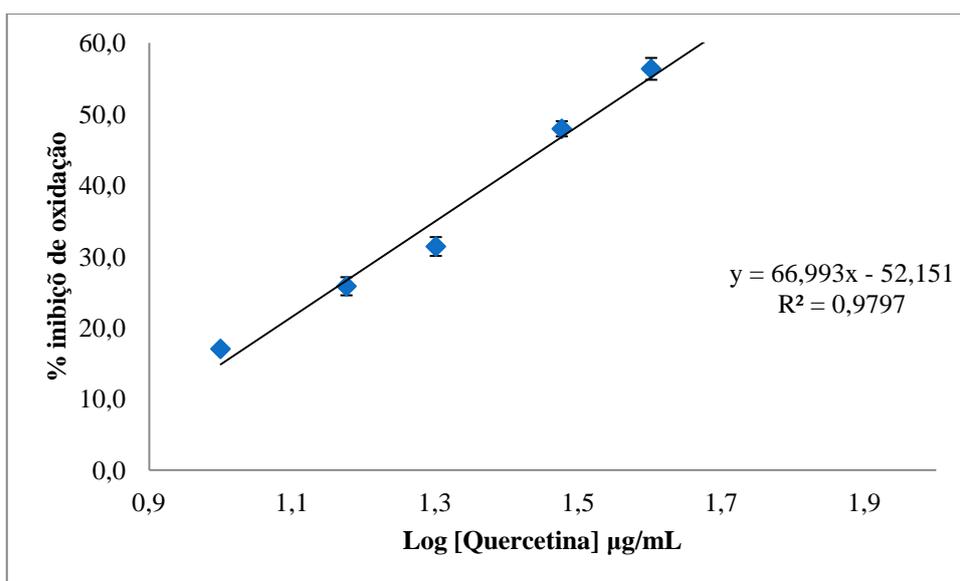


Figura IV – Atividade antioxidante (% de inibição de oxidação) do padrão Quercetina, pelo método pelo método β -caroteno/Ácido linoleico. Os valores correspondem à média de 6 replicados.

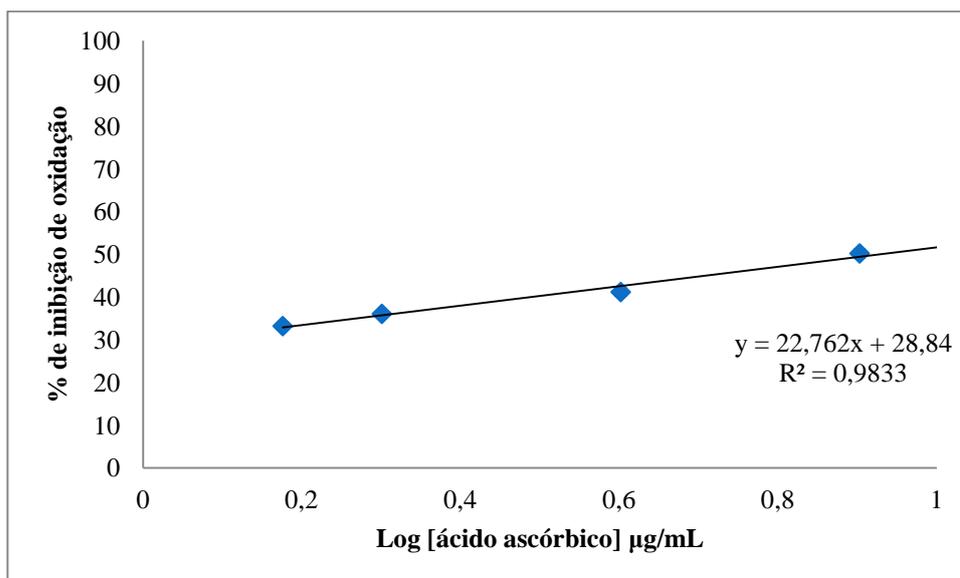


Figura V- Atividade antioxidante (% de inibição de oxidação) do padrão ácido ascórbico, pelo método pelo método β -caroteno/Ácido linoleico. Os valores correspondem à média de 6 replicados.

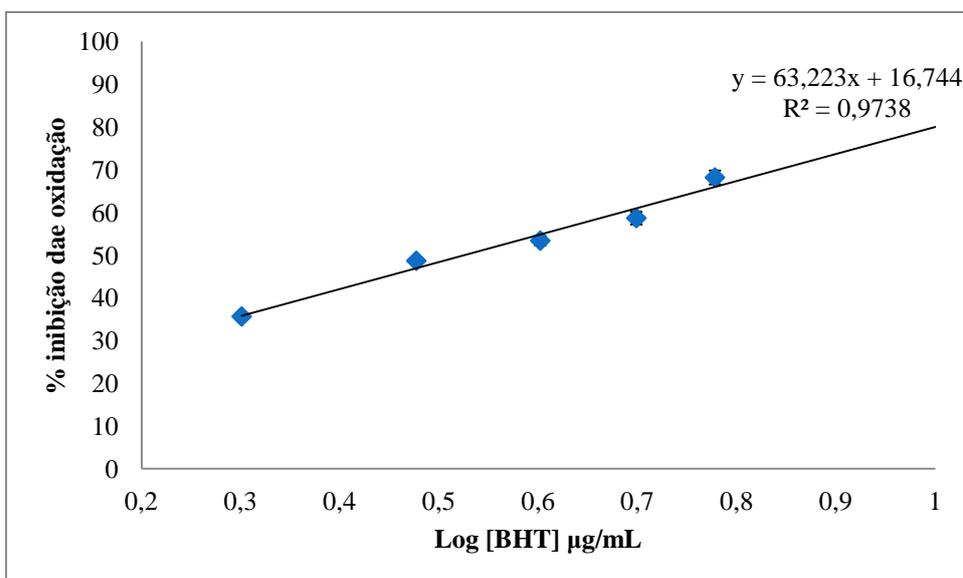


Figura VI – Atividade antioxidante (% de inibição de oxidação) do padrão BHT, pelo método pelo método β -caroteno/Ácido linoleico. Os valores correspondem à média de 6 replicados.

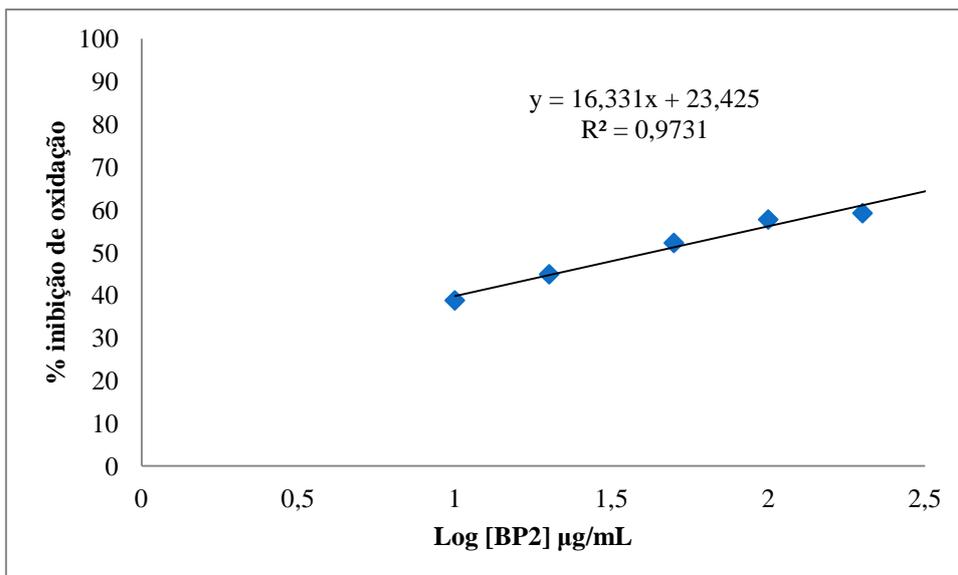


Figura VII – Atividade antioxidante do bisfosfonato BP2, pelo método β -caroteno/Ácido linoleico. Os valores correspondem à média de 6 replicados.

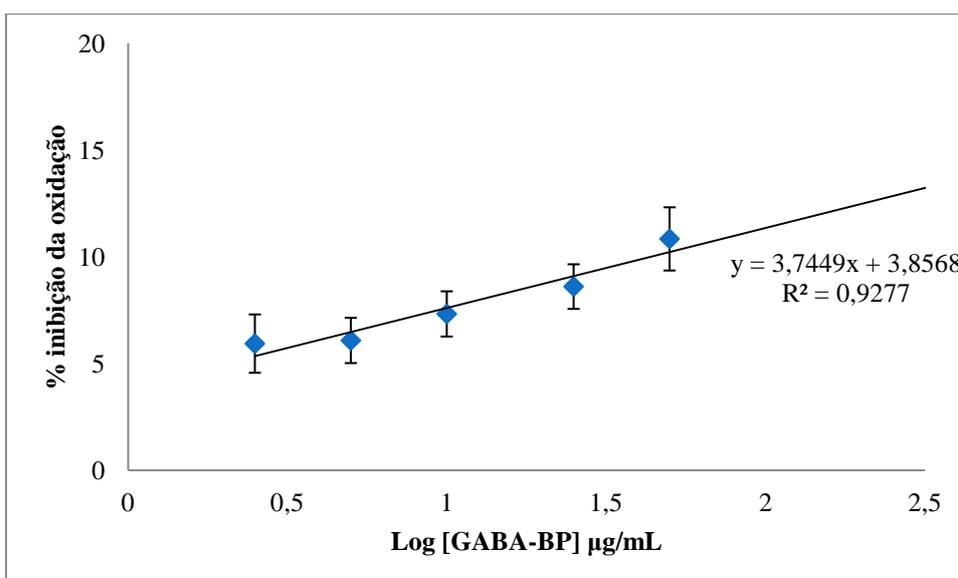


Figura VIII – Atividade antioxidante do bisfosfonato GABA-BP, pelo método β -caroteno/Ácido linoleico. Os valores correspondem à média de 6 replicados.

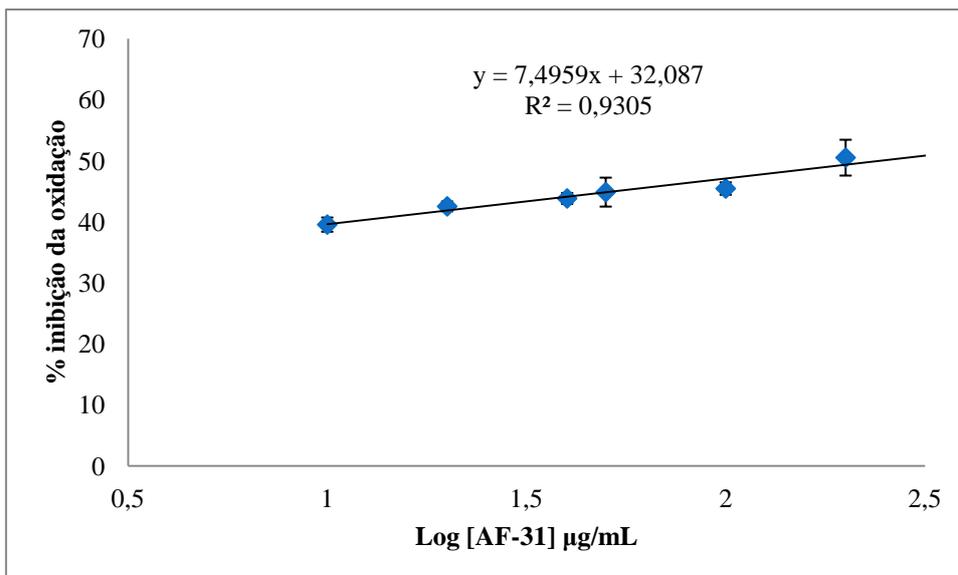


Figura IX – Atividade antioxidante do bisfosfonato AF-31, pelo método β -caroteno/Ácido linoleico. Os valores correspondem à média de 6 replicados.

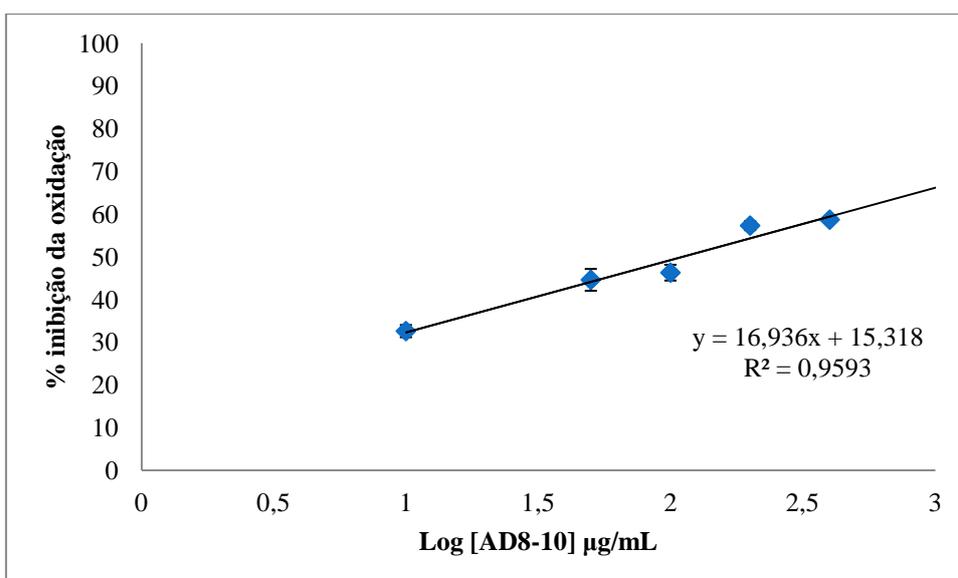


Figura X – Atividade antioxidante do bisfosfonato AD8-10, pelo método β -caroteno/ácido linoleico. Os valores correspondem à média de 6 replicados.

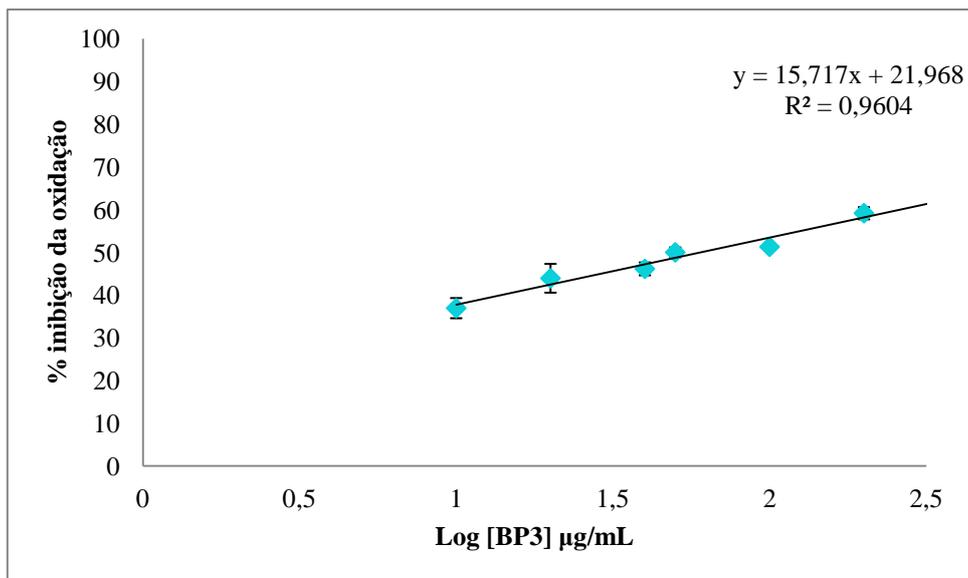


Figura XI – Atividade antioxidante do bisfosfonato BP3, pelo método β-caroteno/Ácido linoleico. Os valores correspondem à média de 6 replicados.

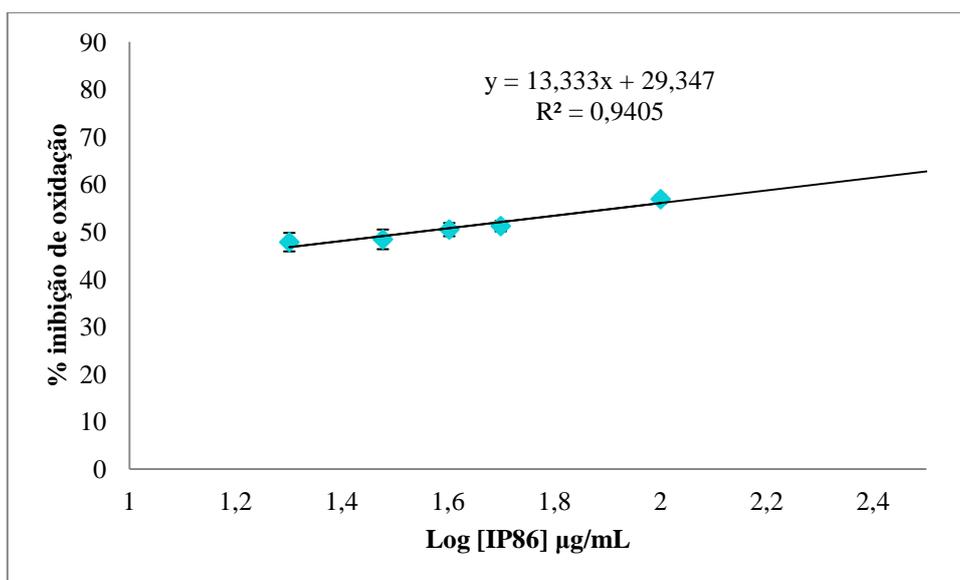


Figura XII – Atividade antioxidante do bisfosfonato IP86, pelo método β-caroteno/Ácido linoleico. Os valores correspondem à média de 6 replicado

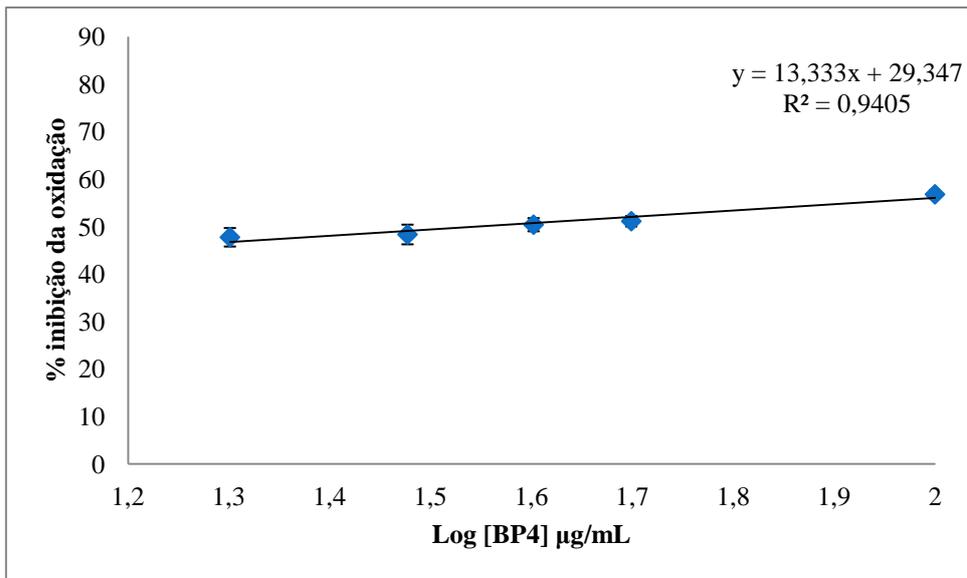


Figura XIII – Atividade antioxidante do bisfosfonato BP4, pelo método β -caroteno/Ácido linoleico. Os valores correspondem à média de 6 replicado

Anexo II – Avaliação da toxicidade dos BPs face a *Artemia salina*

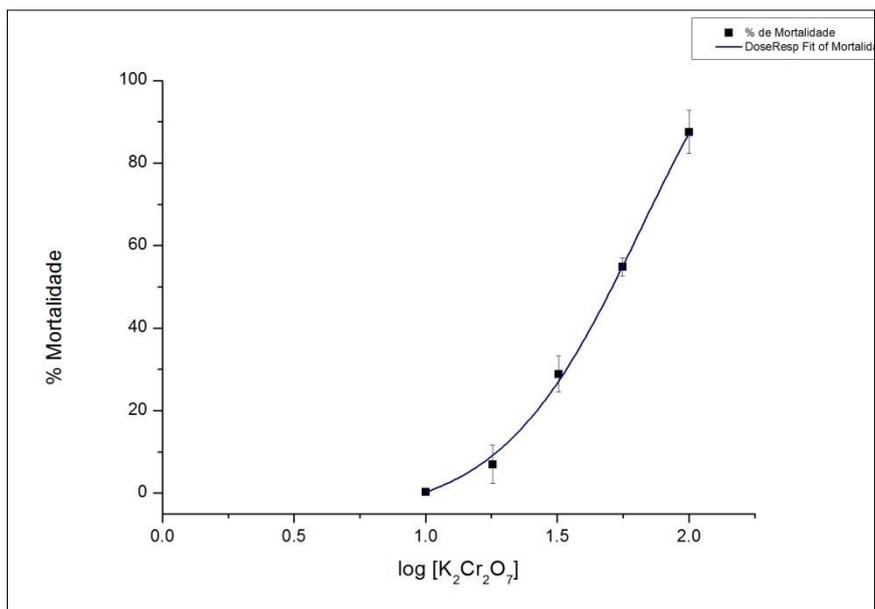


Figura I – Curva dose-resposta do padrão $K_2Cr_2O_7$ (dicromato de potássio). Os valores correspondem à média de 6 replicados.

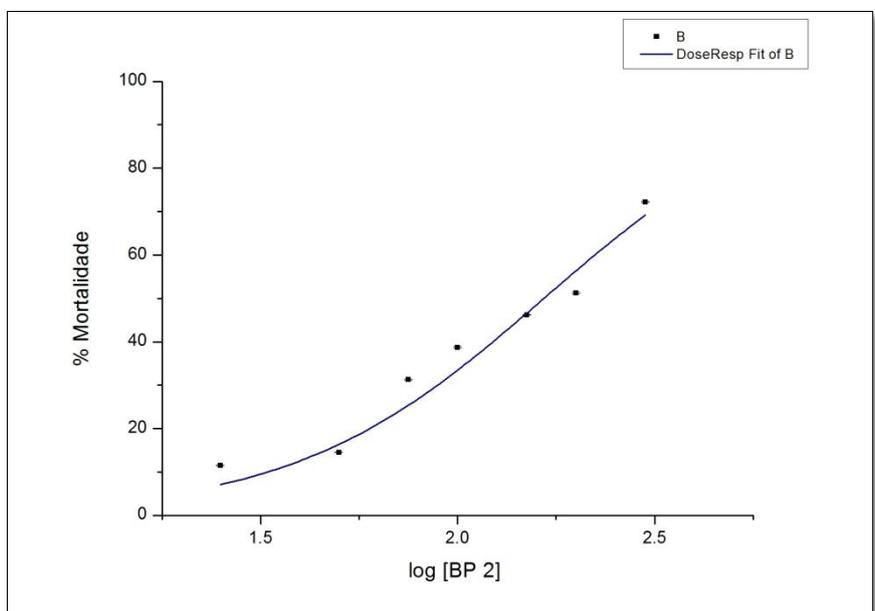


Figura II- Curva dose-resposta do BP2. Os valores correspondem à média de 6 replicados.

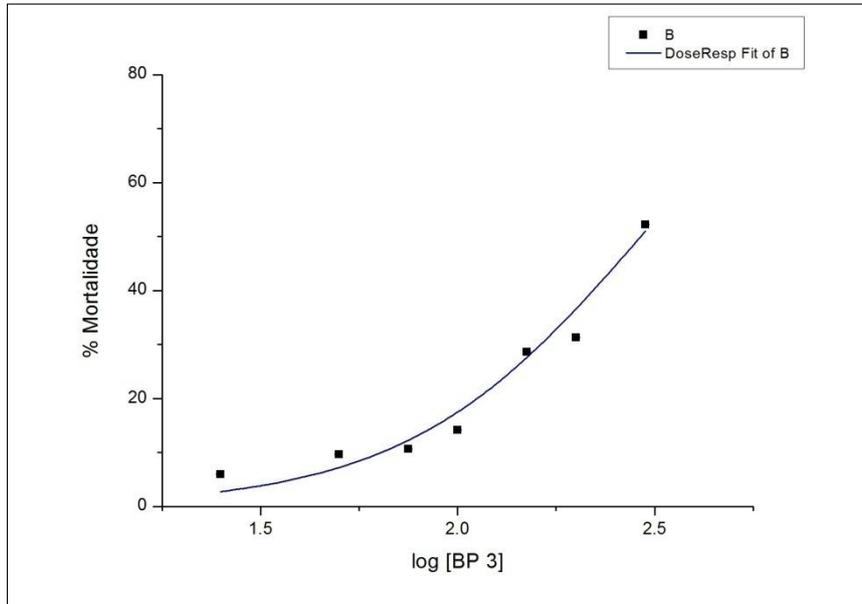


Figura III- Curva dose-resposta do BP3. Os valores correspondem à média de 6 replicados.

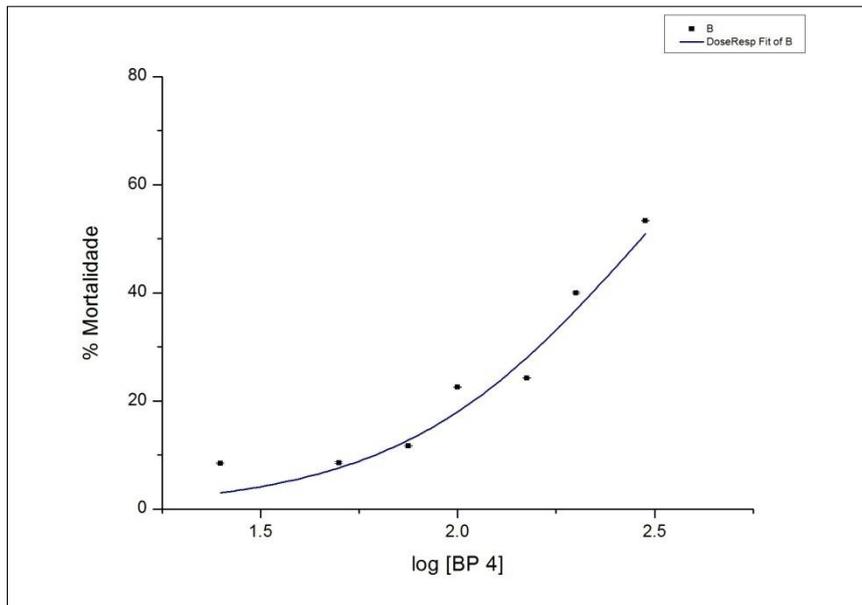


Figura IV- Curva dose-resposta do BP4. Os valores correspondem à média de 6 replicados.

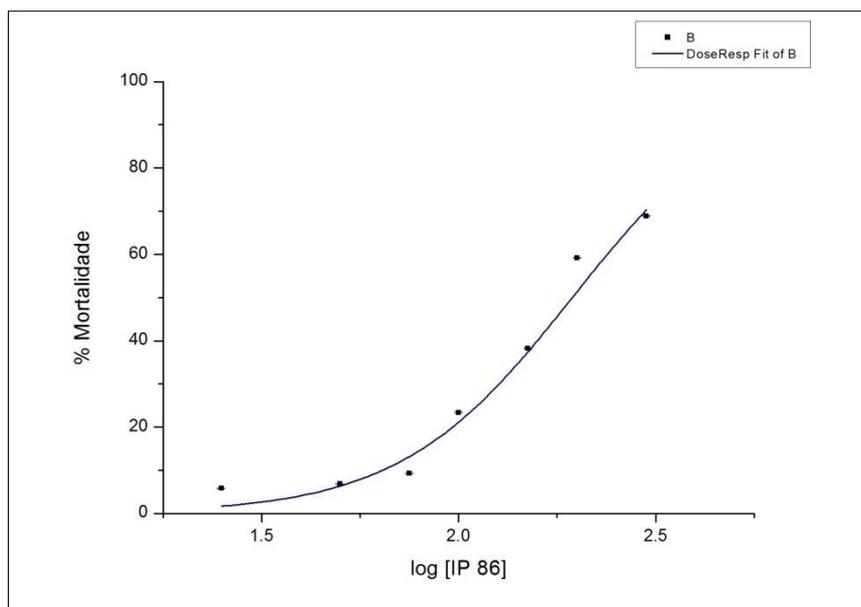


Figura V- Curva dose-resposta do IP86. Os valores correspondem à média de 6 replicados

Tabela I- Mortalidade de *Artemia salina* do composto BP2.

	A1	A1	A2	A2	LOGx0	LOGx0	p	p	EC50	Statistics	Statistics
	Value	Error	Value	Error	Value	Error	Value	Error	Value	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square
BP2	0	0	100	0	2,21919	0,02107	1,36227	0,11734	165,6489	1119,78924	0,9758

Tabela II- Mortalidade de *Artemia salina* do composto BP3.

	A1	A1	A2	A2	LOGx0	LOGx0	p	p	EC50	Statistics	Statistics
	Value	Error	Value	Error	Value	Error	Value	Error	Value	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square
BP3	0	0	100	0	2,4653	0,02391	1,4488	0,1471	291,9413	1509,74809	0,97559

Tabela III- Mortalidade de *Artemia salina* do composto BP4.

	A1	A1	A2	A2	LOGx0	LOGx0	p	p	EC50	Statistics	Statistics
	Value	Error	Value	Error	Value	Error	Value	Error	Value	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square
BP4	0	0	100	0	2,46617	0,04433	1,41334	0,21364	292,5285	2542,44132	0,9149

Tabela IV- Mortalidade de *Artemia salina* do composto IP86.

	A1	A1	A2	A2	LOGx0	LOGx0	p	p	EC50	Statistics	Statistics
	Value	Error	Value	Error	Value	Error	Value	Error	Value	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square
IP86	0	0	100	0	2,28869	0,02226	1,98438	0,19317	194,3978	1770,36766	0,98028

Tabela V- Mortalidade de *Artemia salina* o padrão $K_2Cr_2O_7$.

	A1	A1	A2	A2	LOGx0	LOGx0	p	p	EC50	Statistics	Statistics
	Value	Error	Value	Error	Value	Error	Value	Error	Value	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square
$K_2Cr_2O_7$	-	1,161	101,61	17,417	1,71189	0,0658	2,5548	0,54	51,509	1,93623	0,98935
	0,93564	74	86	47		6	9	231	41		

Anexo III- Avaliação da atividade antimicrobiana

Tabela I- Registo do crescimento em meio líquido para determinação do valor de CMI para o BP3

		[BP ₃] (µg/mL)					
	Microrganismos	31,25	62,5	125	250	500	1000
	<i>Proteus</i>	++	+	-	-	-	
		++	+	-	-	-	
		++	+	-	-	-	
	<i>Salmonella</i>	++	++	+	-	-	
		++	++	+	-	-	
		++	++	+	-	-	
	<i>Morganella</i>	++	+	-	-	-	
		++	+	-	-	-	
		++	+	-	-	-	
	<i>E. coli</i>	++	+	-	-	-	
		++	+	-	-	-	
		++	+	-	-	-	
	<i>Klebsiella</i>	++	+	-	-	-	
		++	+	-	-	-	
		++	+	-	-	-	
	<i>E. faecalis</i>	++	++	+	+	+	-
		++	++	+	+	+	-
		++	++	+	+	+	-
	<i>S. aureus</i>	++	++	+	+	+	-
		++	++	+	+	+	-
		++	++	+	+	+	-